

N° d'ordre :

THÈSE

présentée à la

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

pour obtenir

Le Grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Richard VALENCIA

Sujet de la Thèse : SYNTHÈSE DES COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE ET
AVITAMINOSE B 12 CHEZ LE RAT NORMAL ET LE RAT AXENIQUE.

18 NOV. 1970

Soutenue le

1970 devant la commission d'examen

M. M. PASCAUD.....Président

MM. F. CHAPEVILLE.....
R. JACQUOT.....

} Examineurs

J. HOUGET.....Invité

PARIS 1970

THÈSE

présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université de Paris

pour obtenir

Le Grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Richard VALENCIA

Sujet de la Thèse : SYNTHÈSE DES COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE ET
AVITAMINOSE B12 CHEZ LE RAT NORMAL ET LE RAT AXENIQUE.

Soutenue le 1970 devant la commission d'examen

M. M. PASCAUD.....Président

MM. F. CHAPEVILLE.....
R. JACQUOT.....

} Examineurs

J. HOUGET.....Invité



A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma femme et mon fils

On juge un arbre à ses fruits. Si les fruits sont bons c'est que l'arbre a quitté l'état sauvage et le mérite en revient au jardinier. J'ai conscience d'avoir été, pour mon Maître R. JACQUOT un arbre difficile à mener à maturité. Quoi qu'il en soit pour les fruits, ce dont je suis sûr est que Mr. JACQUOT a été un jardinier s'oubliant lui-même et faisant tout pour que l'arbre s'épanouisse dans le respect le plus total de sa personnalité.

J'ai eu deux Maîtres. Il se trouve que ces deux Maîtres sont amis. Je ne peux les dissocier ici. A l'occasion, mais aussi par delà la contingence d'un Doctorat, je suis heureux de leur dire hautement ce que je leur dois :

- je dois à mon Maître R. JACQUOT, parce qu'il est venu en second, l'indulgence, l'enthousiasme, la tenacité et la souplesse, les visions larges et précises, presque fulgurantes, sur les possibilités et l'exploitation d'une voie de recherche,

- je dois à mon Maître J. HOUGET, parce qu'il est venu en premier, la méfiance, la rigueur, l'attachement à notre métier, le souci de perfection si possible dans le travail,

- mais je dois à tous les deux surtout, la soumission aux faits et leur préséance sur les théories.

Je voudrais bien que mes Maîtres aient déteint sur moi. Dans un monde où la Science très sollicitée risque bientôt d'être soumise, si elle ne l'est déjà, aux tentations du "Vedettariat", j'ai reçu de mes Maîtres un exemple d'esprit scientifique fait de probité et même d'humilité devant la connaissance.

J'éviterai de remercier mes Maîtres: pour de tels dons les remerciements sont dérisoires. Je leur fais la promesse que leur exemple vivant sera sauvegardé et transmis.

* * *

Je voudrais associer à cet hommage, Monsieur Th. CAHN qui a eu sur moi une influence moins directe mais mon séjour dans son laboratoire, sa bienveillance extrême, sa curiosité passionnée et universelle ont permis que s'affermisse en moi le goût de la Recherche.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552011_0015

Si l'exécution d'une thèse est laborieuse, c'est un difficile travail aussi que d'en assurer la direction. Monsieur le Professeur M. PASCAUD a bien voulu présider aux destinées de la mienne et, en me faisant quelques critiques et me donnant d'utiles conseils, m'a apporté la preuve de sa grande bienveillance à mon égard. Qu'il en soit très vivement remercié et qu'il sache combien je lui en suis reconnaissant.

Mr. le Professeur F. CHAPEVILLE, malgré ses nombreuses occupations a bien voulu accepter de faire partie de mon jury. C'est un honneur auquel je suis très sensible et je lui demande de trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.

C'est grâce à mes amis P. RAIBAUD, Directeur du laboratoire d'Ecologie Microbienne du C.N.R.Z. et le Dr. E. SACQUET, Chef du service des animaux axéniques du C.N.R.S., qu'il m'a été possible, à moi profane, d'entrer dans le domaine de la microflore intestinale et des animaux sans flore. Les services rendus sont de grande valeur et la gentillesse à les rendre les a fait encore plus précieux. Merci à tous deux.

A bon droit, mon collaborateur et ami N'GUYEN CÔNG HAN, peut dire que cette thèse est aussi la sienne, car le travail qu'elle a coûté fut pour beaucoup son travail. Il sait combien mon plus vif désir tient à ce qu'il me soit donné de lui témoigner une amitié et une reconnaissance non verbales et que je puisse faire pour lui autant qu'il a fait pour moi.

Au moment d'évoquer la maison qui m'a accueilli, le Centre de Nutrition du C.N.R.S., je voudrais témoigner à Monsieur le Professeur TERROINE, initiateur et animateur infatigable des études nutritionnelles en France, l'expression de mon admiration et de mon respect. Qu'il soit assuré que la vénération que lui porte mon Maître R. JACQUOT a été, elle aussi, transmise.

Que dire de mes collègues sinon que j'ai toujours trouvé en eux l'aide efficace ou le réconfort si nécessaires dans cette course-croisière aux nombreux déboires et péripéties qu'est la recherche scientifique. Au cours des 9 ans auxquels se chiffre mon ancienneté actuelle au laboratoire de Mr. R. JACQUOT, je crois bien qu'il n'y a pas un seul travailleur de cette maison auquel je ne sois redevable d'un conseil éclairé ou d'un service rendu. " Un voisin vaut un cousin " est un proverbe corse, m'a dit Mr. Jean, et je dois avouer que tous mes voisins de cette grande maison ne m'ont jamais mesuré leur aide. Aussi mes plus vifs remerciements vont à tous et notamment à Mlle T. TERROINE pour sa gentillesse jamais démentie, à Mlle G. BOURDEL, à Mesdames RAULIN, LEFEBVRES-BOISSELOT, F. GAUDIN et leurs collaborateurs, à Mrs. J. ADRIAN, J. ABRAHAM et leurs collaborateurs, à J.C. BLUM de qui je fus un élève difficile mais reconnaissant, aux collaborateurs de Mr. LAMBIOTTE et enfin à LAMBIOTTE lui-même, vieux frère, avec qui nous avons navigué de conserve depuis 20 ans, toujours dans l'espoir, souvent déçu mais inextinguible, de crier "Terre!" et d'accoster sur les rivages hospitaliers de la Découverte.

*
* *

Une mention toute spéciale au Secrétariat de Mr. JACQUOT, en particulier à Mme S. SEIGE de qui je dirai que la tâche la plus ingrate lui incombe, dur travail mené toujours contre la montre, avec le sourire et la bonne humeur " sans éclipses ". A elle comme à Mmes S. FINEL et G. MASSON vont mes remerciements très sincères.

- SYNTHÈSE DES COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE ET
=====

AVITAMINOSE B₁₂ CHEZ LE RAT NORMAL ET LE RAT AXENIQUE -
=====

INTRODUCTION -
=====

Le rôle de la microflore du tube digestif vis-à-vis de l'animal qui l'abrite est complexe. Cette flore utilise les nutriments de l'hôte à son profit et joue ainsi un rôle prédateur. Mais elle exerce également une action bénéfique, soit par la dégradation de certains aliments qui deviennent plus facilement assimilables, soit par la synthèse de certains facteurs indispensables tels que les vitamines.

Si la biosynthèse des vitamines est certainement bénéfique pour l'économie de l'animal, elle constitue une gêne dans l'étude des avitaminoses, surtout lorsque celui-ci se livre à la coprophagie, comme c'est le cas du Rat. Chez cette espèce la carence en vitamine B₁₂ est d'autant plus difficile à réaliser que le besoin essentiel est infime, inférieur à 100 millimicrogrammes par jour. De ce fait toutes les tentatives pour utiliser cet animal aux fins d'un dosage biologique de la vitamine B₁₂ se sont soldées par un échec.

Pour des raisons bien connues le rat est, cependant, un matériel d'expérimentation très avantageux et beaucoup d'auteurs n'ont pas renoncé à s'en servir pour l'étude de l'avitaminose B₁₂. Ils ont alors utilisé des régimes non seulement carencés mais aussi très déséquilibrés ou encore additionnés de produits, les uns accélérant le métabolisme général, d'autres bloquant le métabolisme de la vitamine B₁₂. Il est certain que ces pratiques si elles permettent d'obtenir de façon plus précoce un état carencé, ou certains caractères de cet état, peuvent aboutir à une forme pathologique différente de la carence réelle.

Il nous a paru intéressant de nous adresser au Rat amicrobien ou axénique. Dans ce cas tous les obstacles à l'établissement de la carence, dus à la présence de la microflore du tube digestif, sont levés. Il va sans dire que nous ne prétendons pas avoir affaire à un rat "normal" et que les résultats ainsi obtenus devront être appliqués avec circonspection aux animaux porteurs de microflore qui représentent, tout de même, la règle commune de l'espèce. Du moins serons-nous certains que les signes observés auront bien comme seule origine l'absence de vitamine B12 de la ration alimentaire.

Avant de définir de façon plus complète l'objet de notre étude, avant d'exposer les conditions et les limites de notre travail expérimental, il a paru nécessaire de rappeler les principales données connues sur la vitamine B12 et les cobalamines, sur leurs sources et leur synthèse par les bactéries, sur les fonctions métaboliques qu'on leur attribue, enfin sur les carences qu'on peut obtenir chez l'animal supérieur et la définition du besoin en cette vitamine (*). Cela revient, en somme, à situer le domaine de notre recherche dans le cadre forcément plus large des problèmes posés par la vitamine B12 et ses analogues et à permettre de relier nos observations soit aux connaissances acquises, soit aux questions non encore résolues et auxquelles nous pouvons, dans une certaine mesure, apporter quelques précisions.

*

* *

La vitamine B12 et la nomenclature des cobalamines -

La vitamine B12 est un principe actif individualisé à partir du foie et assimilé au "facteur des protéines animales" (156 144), qui s'est révélé le plus efficace pour le traitement de l'anémie pernicieuse de l'homme, ou anémie de BIERMER (173). Elle porte

(*)- L'essentiel des données concernant la vitamine B12, complétant notre succinct résumé, peut être trouvé dans la remarquable monographie METHUEN (113) qui a pour auteur E. LESTER SMITH des Laboratoires Glaxo, l'un des "découvreurs" de la vitamine en 1948.

le numéro 12 dans le groupe des vitamines B à la suite de travaux concernant d'autres facteurs antianémiques qui avaient été désignés sous les termes de B10 et B11, noms qui par la suite, du fait de la non identification des facteurs correspondants, sont restés inemployés. Elle comprend essentiellement (112,28,84):

- un noyau "corrine", composé de quatre noyaux pyrroles à l'instar des porphyrines, mais qui n'a pas de carbone de liaison C_{20} entre les noyaux A et D ce qui fait que dans la numérotation des atomes du noyau corrine on passe du C_{19} au N_{21} afin de garder les analogies avec les porphyrines,

- un atome de Cobalt lié aux quatre N des pyrroles par des liaisons de coordination,

- une liaison de coordination de ce Co, conventionnellement "inférieure" par rapport au plan du noyau corrine, avec un nucléotide, le diméthylbenzimidazol. Le remplacement de ce nucléotide par d'autres conduit aux principaux analogues cobalamines naturels que l'on a pu trouver, notamment chez les microorganismes. Ce nucléotide semble responsable de la spécificité d'utilisation de la molécule par les organismes ou par certains de leurs systèmes métaboliques. Suivant le nucléotide une cobalamine sera "active" ou "inactive",

- une liaison de coordination "supérieure" par rapport au plan du noyau qui est le site d'activité fonctionnelle. Cette liaison unit le Cobalt à un radical généralement monocarbone : CN (cas de la vitamine B12 proprement dite), CH_3 , azoté (NO_2), oxygéné (OH) (168), hydroxyalcoylé (202), ou encore à un nucléoside : adénosine (coenzyme B12). Il s'agit là aussi d'analogues cobalamines mais étant donné que ce sont des formes toutes actives pour l'animal supérieur, transformables l'une dans l'autre de façon réversible, nous nous proposons au cours de ce travail de les appeler "analogues B12". Cette distinction est d'autant plus pratique qu'un de nos microorganismes de dosage peut les détecter à l'exclusion des autres analogues cobalamines,

- des chaînes latérales se trouvent attachées extérieurement aux carbones du noyau corrine comprenant des radicaux acétamides et propionamides en une configuration d'alternance de chaînes longues et courtes (noyaux pyrrolles A et B) et de tendance à la symétrie (noyaux C et D) rappelant en gros la structure de l'uroporphyrine III. Une longue chaîne propionamide du noyau D va se lier au nucléotide "inférieur" par l'intermédiaire de molécules de propanol et de phosphate unies par liaison ester, le troisième oxhydre de ce dernier étant ionisé et neutralisant, dans l'ensemble de la molécule, l'ion positif Co^+ (voir formule développée).

- FORMULE -

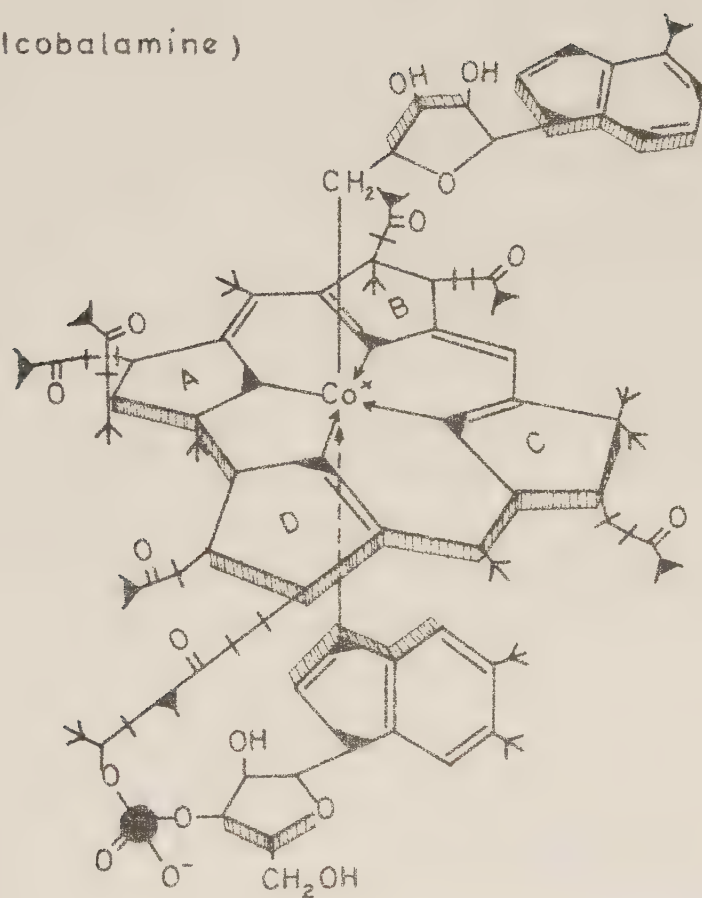
Cette molécule prend le nom de cyanure de 5,6-diméthylbenzimidazolyl -cobamide (le terme de cobamide étant employé lorsqu'on précise le nom du nucléotide inférieur) ou cyanocobalamine (le terme de cobalamine étant généralement réservé aux formes B12, on dit ainsi adénosylcobalamine pour le coenzyme B12, cobalamine étant alors accolé au nom du nucléotide "supérieur"). En l'absence de nucléotide "inférieur" (cas du facteur B) la molécule prend le nom de cobinamide (113).

Sources des cobalamines et synthèse par les bactéries -

Depuis plusieurs années avant la découverte de la vitamine, les extraits de foie servaient au traitement de l'anémie pernicieuse (126). Tout naturellement le foie est utilisé pour l'isolement de la vitamine (47,156,111). La plupart des tissus et organes animaux en contiennent et, bien que les reins aient été reconnus comme un matériel riche en cobalamines et le tissu meilleur fixateur lors des expériences avec la vitamine marquée (60,141,154,103,42), c'est le foie par l'importance de son volume qui est normalement utilisé pour l'extraction à partir des tissus animaux. A noter aussi la relative richesse des extraits solubles de poisson (113,158). Les végétaux

COENZYME B₁₂

(adénosylcobalamine)



Signes	{		CH ₃		NH ₂
		+	CH ₂		NH
		FO	CO		} N {
		●	P		

ne semblent pas contenir des cobalamines, du moins sous leur forme connue, en quantité appréciable (69,62,27,133). Celles qui ont été trouvées dans les légumineuses ont été mises sur le compte des nodules à bactéries nitrifiantes (105).

Le pouvoir de synthèse des microorganismes a donné lieu à un riche ensemble d'études. Avant même l'isolement de la vitamine B12, le "facteur des protéines animales" est retrouvé dans les fèces de Poule (159) et de Vache (160) et leurs extraits sont utilisés comme supplément à la ration alimentaire des animaux. L'identification de ce facteur de croissance avec la vitamine B12 a été faite par LILLIE et coll. (114); parallèlement les extraits sont utilisés dans le traitement des anémies pernicieuses (174). Depuis, la biosynthèse de cette vitamine et de ses analogues a été démontrée dans le tube digestif ou les fèces de l'homme (36), du rat (50), du mouton (1), du porc (39). Des revues concernant cette biosynthèse ont été faites par FORD et coll. (63), COATES et coll. (45), KON et PORTER (107) et MICKELSEN (125). Nous avons, nous-mêmes, précisé le pouvoir de synthèse du rumen artificiel de mouton (181).

Cependant peu d'auteurs se sont attachés à déterminer le rôle, dans la synthèse des cobalamines, des différentes espèces microbiennes qui constituent la microflore du tube digestif. Des études restreintes ou imprécises ont porté sur des bactéries aérobies et des champignons isolés des fèces de Poulet (76), de Lapin (101) et de divers animaux (20). DRYDEN et coll. (57), les premiers, ont montré que des bactéries anaérobies strictes du rumen de vache : Selenomonas ruminantium, Peptostreptococcus elsdenii et certains anaérobies stricts non identifiés synthétisaient in vitro la vitamine B12 et ses analogues.

En dehors des microorganismes de la flore intestinale, l'année même de la découverte de la vitamine B12 (1948), était mis en évidence le pouvoir synthétique de Streptomyces griseus (157) et bientôt la vitamine pouvait être obtenue en tant que sous-pro-

duit de la culture industrielle de S. griseus et S. aureofaciens. Depuis, d'autres microorganismes cultivés spécialement, S. Oliva-ceus (108); Bacillus megatherium (22) et surtout Propionibac-terium shermanii et P. freudenreichii (33), ont donné des ren-dements très supérieurs. D'autres fermentations particulièrement économiques, ont pu être utilisées, notamment celles des mélaesses par Methanobacterium, organisme thermophile (180,197), des sous-produits du lait (32,102) et surtout celles des boues d'égoût ac-tivées dont les cobalamines produites servent à enrichir les ali-ments du bétail (132,163).

On voit l'importance capitale des bactéries et protis-tes dans la synthèse des cobalamines naturelles. D'autres microor-ganismes ont joué un rôle considérable par leur besoin de vitamine B12, ou de cobalamines, en tant que facteur de croissance. Ce sont ceux qui ont permis des dosages rapides de la vitamine, plus pré-cis que les dosages biologiques : l'emploi du premier d'entr'eux Lactobacillus lactis Dornier (167,73) a permis à l'équipe de RICKES et coll. (156) de parvenir avant d'autres à la découverte de la vitamine. Les microorganismes-test actuellement les plus usi-tés sont Lactobacillus leichmanii (122,185), Escherichia coli 113-3 (35,169) pour le dosage des cobalamines totales et Euglena gracilis (188) et Ochromonas malhamensis (64) pour la vitamine B12 (ou plus exactement pour l'ensemble des formes B12 possédant le nucléo-tide benzimidazol).

Fonctions métaboliques des cobalamines-

Les études les plus poussées et les plus fécondes sur les problèmes des fonctions métaboliques des cobalamines, et de la vitamine B12 ont porté précisément sur les microorganismes servant à leur dosage, en particulier les bactéries qui présentent la par-ticularité d'être sensibles à d'autres métabolites jouant un rôle vicariant à l'égard de la vitamine B12. C'est ainsi que la méthio-

nine agit en tant que facteur de croissance pour le mutant E. coli 113-3 en l'absence de vitamine B12(49) tandis que les désoxyribosides ont un pouvoir analogue pour les lactobacilles de dosage (201). Des travaux nombreux ont été faits sur ces pouvoirs vita-riants de la méthionine(31,65,66,194) et des désoxyribosides (18, 23) chez les microorganismes. Les relations entre la méthionine et la vitamine B12 ont été recherchées chez l'animal (8,52,119) et l'enzyme responsable de la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine a été étudié mettant en évidence l'action con-jointe de la vitamine B12 et de l'acide folique (193,74,31,119). Il en a été de même pour les relations de la vitamine B12 avec les désoxyribosides qui posent le problème de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique chez le microorganisme(55,19,3,23) et chez l'animal (2,152,120).Ici aussi la vitamine B12 et l'acide folique interviennent, mais à des étapes différentes (110): la première dans la désoxydation du ribose, en tant que coenzyme de la ribonu-cléoréductase (55,25), l'acide folique dans la méthylation de l'u-ridine en thymidine (94,89,176) sans intervention de la vitamine B12, si ce n'est dans la synthèse préalable des formes actives ré-duites, les tétrahydrofolates (80,6,7). Cependant, bien que l'exis-tence de ces voies métaboliques ait été largement démontrée dans plusieurs systèmes cellulaires, il ne semble pas qu'elle puisse être généralisée (113).

D'autres fonctions métaboliques ont été mises en évidence où la vitamine B12 intervient comme coenzyme de la gluta-mate-mutase chez Clostridium tétanomorphum, action enzymatique dont l'étude a permis la découverte du coenzyme B12(16), dans la méthyl-malonylisomérase chez Propionibacterium permettant la production d'acide propionique (196) ou inversement, la synthèse de l'acide succinique chez Ochromonas (10) et chez l'animal (37, 153), dans la dioldéhydrase chez Aerobacter aerogenes (67) et Lactobacillus sp. (170) ainsi que dans les enzymes responsables de la formation de CH₄ chez Methanosarcina barkeri (26) et de l'acide acétique

acétique chez Clostridium thermoaceticum (146)).

L'ensemble de ces fonctions a conduit à l'étude des mécanismes d'action du coenzyme B12, similaires en ce qui concerne les réductions et les isomérisations. Dans les deux cas on avance un mécanisme analogue soit par fixation d'un hydrogène ou d'un proton sur le C5' du ribose lié au cobalt (67,68), soit par formation d'un carbanion avec le même C5' (98) ou encore formation de ce carbanion au niveau du C4' du même ribose de l'adénosine (87). Pour ce qui est des méthylations directes l'action de la vitamine passe par la formation de l'analogue méthylcobalamine (104,10,30,194). Pour obtenir cet analogue ainsi que les alcoylcobalamines il est nécessaire de passer par des formes de plus en plus réduites: vitamine B12_r ou le Cobalt devient bivalent et vitamine B12_s qui serait un hydrure de cobalamine au cobalt monovalent (85,53,203,87). Par la photolyse anaérobie des analogues méthylés ou alcoylés on obtient à nouveau la vitamine B12_r tandis que la photolyse aérobie conduit à l'aquocobalamine (vitamine B12_b) (202,204,86) très proche de la forme naturelle hydroxocobalamine (vitamine B12_a) (168,95). La cyanocobalamine (vitamine B12 proprement dite) est surtout une forme d'extraction, bien que se trouvant aussi à l'état naturel dans l'organisme.

Rôle de la vitamine B12 : carence et besoin chez l'animal supérieur.

La diversité des fonctions métaboliques passées en revue donne une idée de la complexité du rôle de cette vitamine chez l'animal supérieur. Si les études sur les microorganismes ont permis de différencier à l'échelle cellulaire les principaux effets de la carence en ce facteur de croissance, si les actions métaboliques principales, en rapport avec les propres biosynthèses de cobalamines ont été mises en évidence chez les microorganismes producteurs, nous trouvons chez l'animal des effets moins facilement dissociables. Les interférences de ces actions vitaminiques multiples ou de l'effet de carence avec les nombreuses fonctions de l'animal font qu'il n'y

a guère d'influence sur les grands métabolismes qui n'ait été évoquée à propos de la vitamine B12.

C'est ainsi qu'ont pu être mis en cause le métabolisme des glucides par l'action sur les groupes sulfhydriles des enzymes glycolytiques (117,118) ou par l'incorporation du glucose marqué dans le glycogène (21), des lipides par l'entremise des substances lipotropes (140,13,51,137) et plus directement des phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol (205,139), des acides aminés et des protéines (11,39,88,190,9,192), des bases puriques et pyrimidiques (79,5, 81, 24) et des acides nucléiques (165,187,191,120). Nombre d'auteurs ont voulu lier ces effets sur la biosynthèse des acides nucléiques à une action directe sur la multiplication cellulaire (200,162). A l'instar des microorganismes on a pu montrer que la méthylmalonylisomérase est active chez l'animal (196,37,153) et l'accumulation du substrat méthylmalonique dans l'urine a pu être choisi comme test de carence légère (99, 12). Par contre la détermination de l'acide formiminoglutamique n'est pas une preuve directe de déficience B12 car son métabolisme est lié plus directement à l'activité folique (171,40,175).

Dans l'ensemble, la vitamine B12 exerce une action anabolisante qui se traduit au niveau de la croissance et du développement (70,44,136,46), dans la protection antiradiations (129) et antitoxique (106,100), ainsi qu'en équilibrant les effets de l'action thyroïdienne (59,177).

Les effets de carence devraient être en rapport avec la multiplicité des fonctions établies. Pourtant, l'action anti-anémiant étant à l'origine des recherches sur la vitamine semblait bien correspondre à un site d'influence et à une action bien localisés. La très grave anémie pernicieuse de BIERMER sensible aux extraits de foie et partiellement à l'acide folique (126,43) a vu disparaître ses risques de rechute seulement avec l'introduction de la vitamine B12 (127,128). La vitamine permet le mûrissement équilibré des différents éléments de la lignée sanguine, lesquels

en son absence montrent un arrêt de la synthèse de l'ADN (145,123), conduisant à un abaissement marqué du rapport ADN/ARN, et prennent des formes anormales (dont les mégalo blasts). Le traitement par la vitamine B12 fait disparaître ces formes anormales, remplacées par des réticulocytes, éléments précurseurs des hématies (43, 128). La nécessité du facteur intrinsèque de CASTLE(96,82), glucoprotéide transporteur de la vitamine B12 au travers de la muqueuse intestinale dans le traitement de cette maladie, ne concerne que l'administration de vitamine B12 par voie orale et n'enlève rien à la spécificité d'action de la vitamine sur les éléments sanguins. En effet, la vitamine B12 suffit lorsqu'elle est introduite directement dans la circulation.

Un autre aspect de la carence chez l'homme consiste en la dégénérescence dite "combinée subaiguë" de la moelle épinière (173,195), survenant chez des malades aux troubles hématologiques légers (195) résistants au traitement par l'acide folique (91, 75).

Chez l'animal, il n'a pas été possible de recréer les conditions d'obtention d'une anémie macrocytaire, si ce n'est par l'utilisation d'antagonistes de l'acide folique chez le porc (38). Les caractères de l'avitaminose B12 sont généralement différents de ce que l'on trouve chez l'homme. La carence affecte surtout la croissance ; en outre on a remarqué chez le porc une incoordination de la ~~marche~~ et des troubles du pelage (97), chez le poulet des lésions rénales et osseuses et à un stade plus précoce un défaut d'éclosion de l'oeuf dû à des malformations embryonnaires (115,143). Celles-ci représentent, avec le retard de croissance, le trouble le plus marqué observé chez le rat(155,134,199,178) ; certains auteurs prétendent avoir provoqué des anémies de carence chez cette espèce (190) mais cela semble être un résultat isolé(8,135, 113), du moins de façon aussi significative.

Les troubles chez les herbivores sont inexistants du fait de la synthèse de vitamine B12 par la flore du tube digestif

en position antérieure (rumen) par rapport au site classique d'absorption de la vitamine par la muqueuse intestinale (jéjunum-iléon). Les moutons n'ont présenté de troubles, guérissables par la vitamine B12, qu'en s'alimentant sur des prairies déficientes en cobalt (121).

Une certaine indépendance vis-à-vis du régime alimentaire carencé en vitamine se retrouve chez les espèces se livrant à la coprophagie, notamment poulet (58, 172), lapin (109) et rat (17, 130), laquelle ne serait même pas nécessaire pour pallier le déficit alimentaire, s'il était confirmé qu'il peut y avoir passage de la vitamine à travers la muqueuse colique (124, 142).

Les difficultés de la mise en carence complète chez le Rat tiennent donc à l'activité de la microflore intestinale mais aussi à un besoin très limité chez un animal aux réserves encore considérables. C'est pourquoi, les effets des régimes carencés, longs à se manifester, sont irréguliers (164, 56, 113). Ceci a conduit les auteurs d'une part à chercher à diminuer les réserves, d'autre part à augmenter artificiellement le besoin. L'épuisement des réserves peut être réalisé chez des animaux provenant d'une mère déjà subcarencée lors de la gestation et de l'allaitement (116, 187, 190). Quant au besoin en vitamine B12 il peut être augmenté soit par l'adjonction aux rations carencées d'une antivitamine (41), d'un extrait thyroïdien ou d'une protéine iodée (151, 71), soit en déséquilibrant les régimes par excès de glucides (48).

Tous ces artifices laissent une ambiguïté dans l'estimation du besoin réel du rat que les auteurs évaluent entre 25 et 100 μg (millimicrogrammes) par jour (70). D'autres conditions contribuent à le rendre difficile à déterminer : sa variabilité suivant l'âge et la période d'activité de l'animal (reproduction ou non) et, peut-être, une certaine adaptation de l'organisme à l'abondance ou à la pauvreté du facteur en cause. C'est ainsi que les études faites sur la vitesse de renouvellement de la vitamine

marquée (77,78,83) renseignent sur son degré d'utilisation, et par conséquent sur le besoin dans des conditions données, mais cette utilisation sera dépendante des variables que l'on vient d'énumérer. En fait le besoin minimum ne devrait pouvoir être déterminé qu'en étudiant le seuil d'apparition des phénomènes de carence. Nous verrons au cours de ce travail que cette notion aussi est aléatoire et difficile à interpréter.

Objet et conditions de notre étude -

Une impression générale peut être tirée de l'ensemble des travaux passés en revue : beaucoup de précisions ont été apportées à la connaissance des fonctions métaboliques de la vitamine B12 et de ses analogues chez les microorganismes sans toujours savoir si les fonctions correspondantes se retrouvent chez l'animal et quelle est l'importance relative de chacune de ces fonctions dans l'organisme. Ainsi, sur le problème capital des effets de la vitamine B12 sur les acides nucléiques, beaucoup de résultats ont été établis, notamment sur le contrôle de la synthèse des désoxyribonucléotides chez L.leichmanii sans que cela éclaire considérablement le mécanisme de blocage de la synthèse de l'ADN dans les lignées sanguines de l'homme en anémie pernicieuse.

Aux nombreux résultats obtenus par les études in vitro correspond donc une certaine incertitude de nos connaissances quand il s'agit de l'animal supérieur. La carence B12 du rat est difficile à réaliser. Même si on l'obtient, son contrôle n'est pas aisé, faute de test de carence sûr et d'application générale. Or, à la lumière des données bibliographiques, l'idée d'une confrontation des essais de carence B12 chez le rat normal et chez le rat axénique permet de donner à notre étude les objectifs suivants :

- chercher à établir une avitaminose B12 vraie chez le rat sans compensation possible par les synthèses de la microflore intestinale,

- connaître le rôle que joue in vivo la flore intestinale et définir la part qui lui revient dans la satisfaction du besoin en vitamine B12 chez le rat normal, au régime carencé,

-savoir quel est le besoin strictement imputable à l'animal, hors de la symbiose flore intestinale-hôte, et ceci grâce à l'étude du rat axénique.

Enfin, les possibilités de collaboration avec une équipe de microbiologistes nous a poussé, en outre, à étudier un certain nombre de conditions de la biosynthèse des cobalamines par les diverses bactéries de la flore intestinale.

Nous avons donc considéré successivement l'activité proprement dite de la microflore intestinale, ce qui implique une étude essentiellement in vitro, et l'incidence de cette activité sur l'économie de l'animal-hôte. Ces deux aspects justifient la division en deux parties de notre travail :

1)- Etude de la production de cobalamines par la flore intestinale du Rat au cours de laquelle nous avons pu préciser, d'une part, quels sont les microorganismes responsables des synthèses principales de cobalamines et comment certaines conditions de milieu peuvent favoriser ces synthèses, d'autre part quelle est l'importance de ces synthèses in vivo suivant les conditions de régime et la période de vie de l'animal.

2)- Etude comparée de la mise en carence B12 du rat normal et du rat axénique qui nous a permis de savoir dans quelle mesure la flore intestinale assure la couverture du besoin B12, et s'oppose par ses effets à l'installation de l'avitaminose, et quelles sont les conditions d'avitaminose B12 des rats axéniques tout en précisant les doses de vitamine capables d'assurer la vie d'entretien ou la reproduction.

Cependant, un des buts visés par l'obtention d'une carence B12, non compensée et suffisamment grave chez le Rat axé-

nique adulte, était de reproduire à volonté les signes de l'anémie pernicieuse de l'homme, et notamment la production de mégalo-blastes. On verra que le Rat s'est révélé réfractaire à l'anémie et que l'analyse des résultats nous a seulement permis de donner une interprétation des caractères de l'avitaminose chez cette espèce par rapport à l'avitaminose humaine et à ses troubles hématologiques.

*

* *

*

- PREMIERE PARTIE -
=====

- PRODUCTION DE COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE DU RAT -

L'étude des microorganismes responsables de la synthèse des cobalamines n'ayant pas été faite chez le Rat nous nous sommes proposé de l'entreprendre en nous appuyant sur les travaux de P. RAIBAUD et collaborateurs concernant la microflore du tube digestif de cette espèce (148,149).

P. RAIBAUD utilisant des animaux à flore microbienne "normale" (dits souvent rats conventionnels) en a isolé et cultivé de nombreuses souches bactériennes. De notre côté nous avons étudié leur pouvoir de synthèse in vitro tant pour les cobalamines totales que pour la vitamine B₁₂. Ces essais ont conduit à rechercher si certains changements dans les conditions de culture affectent l'importance des synthèses, escomptant que les relations trouvées pourraient renseigner sur le déterminisme des aptitudes synthétisantes. Parmi ces conditions nous avons examiné :

- le problème de l'anaérobiose,
- les corrélations avec le pouvoir fermentaire,
- le remplacement du glucose, substrat énergétique habituel,
- le rôle d'un donneur de méthyle, la méthionine.

Enfin s'est posé la question des interactions possibles (synergie et antagonisme) entre microorganismes producteurs et non producteurs de cobalamines.

Si de l'étude des espèces isolées et associées nous passons à celle de la flore intestinale considérée dans son ensemble, il était important de connaître le pouvoir de synthèse de cette flore in vivo. La biosynthèse microbienne des cobalamines est la résultante d'un certain nombre de caractères de la flore intestinale et de ses conditions de vie dont deux facteurs au moins sont à considérer : le pouvoir de synthèse in vivo de chaque souche qui n'est pas nécessairement le même que le pouvoir mesuré in vitro et les proportions relatives des souches productrices ou non

dans le tube digestif des animaux. Pour aborder le problème de la biosynthèse in vivo nous avons dosé les cobalamines et la vitamine B12 dans le contenu de l'intestin, notamment dans le caecum, et nous avons fait une étude succincte des populations bactériennes présentes dans le tube digestif des rats placés au régime carencé. Compte tenu des relations avec l'hôte et des prédatations par des souches non productrices, on peut penser que les valeurs du contenu caecal en cobalamines et en vitamine B12, chez les rats à flore complexe et non contrôlée, sont un reflet du pouvoir de synthèse in vivo de l'ensemble de cette microflore. Nous verrons quelle est son importance pour des rats soumis au régime carencé de la première à la sixième génération.

I - METHODES -

=====

1)- Prélèvement des échantillons de fèces et des contenus intestinaux pour examen ou dosages. Les échantillons sont prélevés à partir de fèces fraîchement émises ou de tractus digestifs provenant de rats sacrifiés à l'éther. Pour l'étude des populations microbiennes les fragments d'intestin sont broyés dans leur totalité à l'aide d'un homogénéiseur "Ultraturrax". Par contre les contenus servant aux dosages sont séparés mécaniquement et mis en suspension aqueuse en vue de leur extraction.

2)- Isolement des souches. Celui-ci se fait dans différents milieux sélectifs. Les milieux primaires contiennent de l'autolysat de levure (1p.100), de la peptone (1,5p.100) et de la tryptone (1p.100) (milieu LAPT); on peut ajouter ou non une quantité donnée de glucose. D'autres milieux sont à base d'hydrolysate de caséine (2p.100), hydrolysate de foie (0,1p.100), extrait de viande (0,1 p.100) et extrait de levure (0,1p.100). Les milieux dits "secondaires" dérivent des précédents par adjonction d'inhibiteurs ou de substances thermolabiles. Le pH est fixé avant autoclavage. La composition détaillée des milieux est décrite dans un mémoire de RAIBAUD et coll. (148).

L'incubation en anaérobiose se fait par ensemencement des milieux dans des tubes longs et minces (400 mm x 8 mm). Pour l'incubation aérobie on utilise des boîtes de Pétri. La température est dans les deux cas de 38°C.

Le repiquage, la purification et l'identification des souches ont été décrits dans le dit mémoire (148). La plupart des souches utilisées dans ce travail ont été classées sommairement en considérant seulement les critères de genre, vu l'imprécision qui existe dans la classification des bactéries anaérobies en espèces.

3)- Culture des souches. Le milieu choisi est analogue à celui qui est le plus utilisé pour l'identification et dans lequel toutes les souches peuvent se développer, soit en g : autolysat de levure 10, peptone 25, tryptone 10, glucose 10, Tween80 1, eau distillée q.s.p. 1000 ml. Ce milieu, comprenant le glucose comme substrat énergétique, a servi à la plupart des cultures mais dans certains cas nous avons utilisé comme source carbonée du lactate ou du pyruvate de sodium à raison de deux molécules pour une molécule de glucose. Le pH du milieu est ajusté à 6,2 pour toutes ses variantes.

Les souches sont repiquées à partir d'une culture jeune (24-36 heures) à raison de 0,2-0,4 ml d'inoculum pour 10 ml de milieu de culture. Cet inoculum important permet aux bactéries de se développer sans phase de latence excessive. Dans le cas des souches anaérobies strictes le milieu de culture est porté au préalable pendant 25 minutes au bain-marie bouillant et refroidi aussitôt afin de chasser la majorité des gaz dissous. Après l'ensemencement un bouchon de gélose assure l'anaérobiose. Les souches anaérobies facultatives sont cultivées en aérobie dans des Erlenmeyer de 25 ml contenant 10 ml de milieu.

Le temps d'incubation est généralement de 3 à 4 jours à 38°C. L'arrêt de la culture se fait en plaçant les tubes au congélateur s'ils ne sont pas traités immédiatement en vue des dosages.

4)- Extraction des cobalamines des milieux de culture.

Les cobalamines sont extrêmement solubles dans l'eau. Elles sont sensibles à la température et à la présence d'air si elles ne sont pas protégées contre l'oxydation. Elles sont moyennement sensibles à la lumière. La stabilité des cobalamines est maximum au pH 4,5. Ces particularités ont déterminé le mode d'extraction choisi: hydrolyse à chaud en milieu acétique en présence d'une substance protectrice contre l'oxydation. Les extractions à froid par des solvants (alcool ou acétone) ont été écartées à cause, soit des faibles rendements obtenus par des auteurs, soit de séparations longues et difficiles (35). Le traitement par des enzymes protéolytiques donne des valeurs trop élevées car ces enzymes contiennent déjà des cobalamines (35,4) (nécessité de prévoir des témoins d'enzymes dont il convient de tenir compte).

- Nécessité des substances réductrices . L'effet destructeur de l'oxygène a bien été mis en évidence (4). Il est donc nécessaire de protéger les cobalamines dès leur extraction. Parmi les substances réductrices utilisées nous citerons les acides organiques soufrés (acide thiomalique, thioglycolique) ou minéraux (sulfites) (4). Le cyanure de potassium que nous avons choisi à la suite de CALET et RERAT (35) exerce une action propre sur la molécule de cobalamine la maintenant sous forme de cyanocobalamine. Cependant nous n'avons pas suivi ces auteurs quant aux quantités de cyanure utilisées pour le dosage avec Escherichia coli, car on pouvait craindre qu'elles ne se révèlent inhibitrices pour le flagellé Ochromonas malhamensis que nous utilisons parallèlement pour le dosage microbiologique de la vitamine B12 proprement dite.

Sous l'action du cyanure on estime que les formes actives chez l'animal supérieur, répondant à la formule 5,6-diméthylbenzimidazolylcobamide, passent pour la plupart à l'état de cyanocobalamine. Rappelons qu'il s'agit essentiellement de l'hydroxocobalamine, la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine (coenzyme B12), ne différant de la vitamine B12 que par la nature du coordinant supérieur.

- Mode opératoire . Selon les cas on utilise soit une partie aliquote, soit la totalité de l'échantillon (10 ml de milieu de culture ou la totalité du contenu caecal mis en suspension dans l'eau bidistillée). On amène le pH à 4,5 avec le tampon de MICHAELIS (acide acétique-acétate de sodium à parties égales) dans la proportion de 30 p.100 du volume final. On ajoute une quantité de cyanure de potassium correspondant à 1 μ g par μ g estimé de cobalamines, cette quantité étant corrigée lors d'une nouvelle extraction en fonction des premiers résultats. On dilue avec de l'eau bidistillée et on autoclave 30 minutes à 120°C. Les solutions d'extraction sont alors ajustées à 100 ml (250 ml pour les caecums) et filtrées. Un dosage préliminaire est fait sur cette solution quitte à diluer davantage si la concentration en cobalamines est plus forte que celle de l'échelle étalon.

Il ne semble pas prudent de conserver pour de longues périodes (plus d'une semaine) un extrait avant dosage à moins de garder les solutions sous azote, au froid, à l'obscurité.

5)- Dosages microbiologiques des cobalamines. Les cobalamines sont indispensables à certains microorganismes qui, dans des conditions déterminées, présentent une croissance proportionnelle à la concentration de ces facteurs dans leur milieu de culture. Les dosages microbiologiques offrent deux avantages : les organismes-test sont capables de détecter, après extraction, le facteur de croissance sans nécessiter la séparation des autres constituants du milieu ; la sensibilité aux faibles quantités est de très loin supérieure à celle que permettent les autres méthodes de dosage, physiques, chimiques ou biologiques. La contre-partie de ces avantages tient aux mêmes particularités : ce que l'on gagne en sensibilité on le perd en précision et en fidélité. En outre, la présence des autres constituants d'un milieu complexe exerce des actions favorisantes ou des inhibitions qu'il faut contrôler ou dont il faut tenir compte. C'est pourquoi la rigueur technique et la normalisation des conditions de travail sont encore plus importantes ici que dans les autres types de dosages.

Nous estimons à 10-15 p.100 la marge d'erreur des dosages selon notre protocole.

- Dosage des cobalamines totales avec *Escherichia coli* 113-3.

Ce mutant, obtenu par irradiation et isolé par action de la pénicilline, est couramment utilisé pour le dosage de l'ensemble des cobalamines. Nous ne tiendrons pas compte des différences de sensibilité à chacun des analogues structuraux qui obligerait à une séparation chromatographique et nous désignerons, dans tout ce travail, ce dosage comme étant celui des cobalamines totales.

La croissance de *Escherichia coli* 113-3 est également sensible à la présence de méthionine. Nous avons vérifié que cet acide aminé peut remplacer les cobalamines dans les proportions pondérales de 20.000 à 50.000 de méthionine pour 1 de vitamine B12 (35,4). Chaque fois que la présence de méthionine en quantité importante pouvait faire craindre une cause d'erreur nous avons soit écarté le résultat, soit procédé au dosage de la méthionine à l'aide de *Leuconostoc mesenteroïdes* afin de corriger en conséquence le résultat du dosage des cobalamines totales.

Nous suivons pour l'essentiel la technique de CALET et RERAT (35) ne la modifiant que pour des points de détail. Le principe du dosage consiste à comparer au bout d'un temps donné la densité de population de *E. coli* cultivé sur la solution à doser à celle d'une culture en solution pure de vitamine B12 de concentration connue, traitée dans les mêmes conditions. Durant la manipulation on évite de soumettre les deux types de solution à de fortes intensités lumineuses.

La souche de *E. coli* 113-3 est repiquée tous les 15 jours environ sur des tubes de gélose inclinée (milieu d'entretien à base de peptone et d'extrait de levure) (35). On incube à 37°C pendant 24 heures, puis on conserve au froid.

L'inoculum est préparé 24 heures avant le dosage par repiquage de la souche sur un bouillon de culture contenant de l'extrait de foie et préalablement traité par le charbon actif, afin d'éliminer la vitamine B12 en excès, filtré et stérilisé (35).

La solution étalon de vitamine B12 contient du cyanure de potassium dans la même proportion que celle utilisée pour l'extraction de l'échantillon. Elle sert à faire une échelle standard contenant de 0,02 à 0,16 $\mu\text{g/ml}$. Le milieu de base synthétique, est celui de BURKHOLDER (34) modifié par CALET et RERAT (35). Les différentes solutions composant le milieu sont conservées à l'état stérile sauf la solution de tryptophane. Dans cette méthode dite "simplifiée " le milieu est réparti dans des tubes (15 x 160 mm) à raison de 10 ml par tube. Les adjonctions de solution étalon et de solution échantillon représentent des volumes variant de 0,1 à 0,4 ml ; ainsi les volumes finaux de chaque tube diffèrent au plus de 4 p.100. Ces milieux de culture sont stérilisés avant ensemencement par autoclavage de 10 minutes à 118°C.

L'ensemencement se fait après dilution, dans une solution de ClNa à 9 p.1000, des cellules décantées de l'inoculum de telle sorte que la turbidité de l'inoculum dilué mesurée à l'électrophotomètre de MEUNIER varie entre 0,5 et 0,6 de densité optique, opacité qu'on peut d'ailleurs apprécier à l'oeil nu avec un peu d'habitude. On introduit à la pipette Pasteur une ou deux gouttes d'inoculum dilué dans chaque tube, cette variation du simple au double n'ayant pas d'incidence sur la réponse. On utilise deux tubes témoins ne contenant que le milieu de base, l'un tel quel afin de contrôler la stérilité du milieu, l'autre inoculé pour mesurer l'apport de vitamine B12 par l'ensemencement. Les tubes sont répartis par portoirs de 24 et couverts stérilement à l'aide d'un seul couvercle métallique par portoir.

L'incubation se fait en étuve à 31°C (35) et sa durée est de 17-19 heures, temps jugé le plus favorable dans nos conditions expérimentales.

Les différences des croissances bactériennes s'apprécient par la densité optique mesurée à l'électrophotomètre de MEUNIER à 550 μ aussitôt après l'arrêt de l'incubation.

- Dosage de la vitamine B12 avec *Ochromonas malhamensis*. Ce flagellé est l'organisme, connu à ce jour, répondant de la façon la plus spécifique à la cyanocobalamine. Aucun des autres analogues actifs

pour E. coli (Facteurs A, B, C et pseudovitamine B₁₂) ne l'est pour O. malhamensis. Les analogues de la vitamine B₁₂ utilisables par les animaux supérieurs et ne comportant qu'une substitution de radical-CN sont directement actifs. Mais ils sont sans doute transformés sous l'action du cyanure, au cours de l'extraction, en vitamine B₁₂ proprement dite. Nous avons vérifié que les quantités de cyanure de potassium utilisé ne nuisent pas à la croissance du flagellé.

Par ailleurs nous confirmons que O. malhamensis est absolument insensible aux quantités de méthionine qu'on peut trouver dans les milieux biologiques ce qui rend cette technique de dosage particulièrement spécifique (90).

Nous suivons les grandes lignes de la méthode de FORD (64) tout en modifiant certains points pour simplifier et rendre plus rapide le dosage (133). Nous avons rapproché ses modalités de la technique adoptée pour E. coli de façon à faciliter notre travail. Nous n'indiquerons ici que les différences qui séparent le dosage par O. malhamensis du précédent en renvoyant à ce dernier pour la conduite générale de l'essai.

La souche de O. malhamensis est conservée au froid en milieu liquide de FORD auquel on ajoute 0,2 µg de vitamine B₁₂/ml. Nous supprimons le maintien à l'étuve à 27°C ainsi que toute source lumineuse intense et nous laissons développer la souche repiquée à la lumière et température du laboratoire pendant trois jours, ce qui permet d'obtenir une croissance moins rapide et d'allonger les intervalles de repiquage à une semaine ou 15 jours selon l'importance de l'ensemencement.

L'inoculum est préparé de la même manière qu'un repiquage normal; il est utilisé généralement après 3 jours de croissance alors que FORD attend 5 jours. On dispose ainsi de cellules plus jeunes tendant à rester en suspension et à ne pas décanter rapidement dans la pipette d'ensemencement. Il est inutile alors de pratiquer une dilution de l'inoculum qu'on utilise directement à raison de 2 gouttes par tube àensemencer.

Le dosage se fait comme pour E. coli en utilisant les mêmes tubes et portoirs. Le volume du milieu de base de FORD est de 5 ml. Les solutions standard et les échantillons sont les mêmes que dans la méthode précédente et on pratique aussi les mêmes prises. On peut donc mener de front ces deux types de dosages. A noter que notre solution standard est 5 fois moins concentrée que celle de FORD (138) d'où nous déduisons, étant donné les bonnes réponses de croissance, que O. malhamensis a une plus grande sensibilité à la vitamine B12 qu'on ne l'a prétendu; sa sensibilité serait, dans nos conditions de travail, presque identique à celle de Euglena gracilis.

L'incubation s'effectue à l'obscurité à 28-30°C en étuve montée sur rails ; les portoirs placés sur des plans inclinés sont soumis à un mouvement de va-et-vient.

Après arrêt de la culture au bout de 72 heures le volume de chaque tube est complété à 10 ml avec de l'eau bidistillée (64). La mesure de la densité optique se fait comme pour E. coli.

6)- Identification et dosage approché des acides gras volatils produits dans les cultures des souches. Nous utilisons la chromatographie gaz-liquide pour déterminer les principaux produits de fermentation in vitro avec injection directe du liquide de fermentation selon ERWIN et coll.(61) , Van EENEME et coll.(186) et BAKER (14) en apportant à la méthode quelques modifications personnelles. Cette méthode évite le long traitement des échantillons par distillation, extraction ou estérification avec les pertes qui peuvent en découler.

- Préparation des échantillons - Le liquide d'incubation après arrêt de la culture, est conservé à l'état congelé afin d'éviter les pertes par volatilisation. La plupart des cultures présentant une faible densité de corps cellulaires, une simple décantation permet une prise d'échantillon limpide en vue de l'injection. On évite ainsi de manipuler ou de risquer d'échauffer les échantillons en les

centrifugeant. Lorsque la culture est foisonnante (Streptomyces et Bacillus) on procède à une filtration sur coton de verre avant l'injection.

- Conditions expérimentales -

- Type d'appareil: GIRDEL (Giravions, France)
- Détecteur à ionisation de flamme.
- Colonne en acier 1m50 x 1/8 de pouce.
- Support de colonne: Chromosorb P (80-100 mesh).
- Phase stationnaire : Diéthylène glycolsuccinate
25 p.100 + acide phosphorique 3 p.100.
- Température : Chambre d'injection.... 150°C
Détecteur 150°C
Colonne 120°C
- Débits : Azote 20 ml/mn
Hydrogène 20 ml/mn
Air comprimé 400 ml/mn
- Quantité injectée : 0,5 µl à la seringue Hamilton
- Durée de l'analyse : 12 minutes pour séparer les
acides en C₂, C₃, C₄.

L'appareil utilisé est très sensible puisque nous choisissons une atténuation de l'électromètre au 1/64 avec des injections de 0,5 µl correspondant à 0,25 µg d'acide volatil standard. L'injecteur permet l'injection directe sur colonne et comporte une chambre de recul chauffée ce qui limite les possibilités d'adsorption et de carbonisation. Cependant une petite adsorption se produit qui donne lieu par lavage à des pics "fantômes" (effet mémoire) avec même temps de rétention que les acides gras étudiés. L'adjonction d'acide phosphorique à la phase stationnaire la rend plus "polaire" assurant une meilleure couverture des surfaces du support et limitant les risques d'adsorption.

Ces pics "fantômes" représentent des pertes qui sont du même ordre de grandeur pour les divers acides de chaque série d'analyses: nous avons donc des mesures absolues par défaut. Une partie de ces pertes peut être récupérée par lavage à l'eau et on peut retrou-

ver ainsi une certaine intégrité de la colonne (14). Nous n'avons pas cherché comme d'autres auteurs la saturation des points d'adsorption par répétition d'injection de l'échantillon. Pratiquement, nous effectuons deux lavages avec 0,5 μ l d'eau alcoolisée à 5p.100 en pensant que la faible importance des quantités injectées détériore au minimum la phase stationnaire de la colonne.

La mesure des surfaces des pics sur le papier d'enregistrement se réalise par triangulation. On compare les surfaces des échantillons à celles des acides standards respectifs sans introduire de standard interne dans l'échantillon; cette simplification fait sans doute perdre de la précision. Cependant, des essais de reproductibilité avec les acides standards fournissent comme écart maximum par rapport à la moyenne les valeurs suivantes : 19 p.100 pour l'acide acétique, 16 p.100 pour l'acide propionique et 7 p.100 pour l'acide butyrique. Si nos conditions de mesure conduisent à des résultats approchés, ceux-ci n'en gardent pas moins une valeur certaine vu l'amplitude des variations observées.

*

* *

*

II - POUVOIR DE SYNTHÈSE DE LA FLORE INTESTINALE -

=====

L'existence de synthèses de vitamines du groupe B par les microorganismes du tube digestif est à ce point connue et admise qu'il est devenu banal de s'y référer. Ce que l'on sait moins c'est la grandeur de la production et la part qu'elle prend dans la couverture des besoins de l'organisme-hôte.

Avant d'entreprendre notre étude sur le Rat nous avons fait quelques expériences sur le pouvoir de synthèse du liquide de rumen de Mouton (181). Nous avons ainsi montré que ce liquide, dilué avec une quantité équivalente de solution minérale (type salive synthétique) et mis à incuber sur un substrat cellulosique pendant 24 heures, est capable de multiplier de cinq à quinze fois les quantités initiales de cobalamines et de vitamine B12. Par exemple : 20 ml de liquide de rumen produisent dans ces conditions jusqu'à 3 µg de cobalamines et 1 µg de vitamine B12. Or, les besoins d'un mouton de 20-25 kg sont estimés à environ 10 µg de vitamine B12 par jour(113) ce qui correspond aux quantités élaborées in vitro et en 24 heures par 200 ml de liquide de rumen mélangés à 10 g de paille.

Les résultats rapportés ci-dessous concernent, d'une part, la capacité de synthèse de chaque souche bactérienne isolée et cultivée in vitro dans des différentes conditions; d'autre part, l'étude de la capacité de synthèse in vivo des populations microbiennes du caecum des Rats soumis à un régime totalement privé de vitamine B12.

A)- SYNTHÈSE DES COBALAMINES IN VITRO PAR DES SOUCHES ISOLÉES DE LA MICROFLORE DU RAT -

1)- Culture des souches purées dans un milieu d'entretien.

En une première étape, nous avons entrepris l'analyse systématique de la production de cobalamines et de vitamine

B12 par 135 souches fraîchement isolées de l'intestin de Rat. Dès le début de cette étude nous avons remarqué que la conservation des souches affaiblit en général leur faculté de synthèse.

Nous avons effectué la culture des différentes souches isolées, toujours pendant le même temps (4 jours), en ensemençant avec des inoculum de même densité microbienne. Le milieu utilisé est le même que celui servant à l'entretien des souches et il n'est pas spécialement conçu pour obtenir un rendement maximum de cobalamines; bien que sa préparation soit faite, autant que possible, de façon identique, ses teneurs en cobalamines et vitamines B12 peuvent osciller autour des valeurs moyennes de 4,5 μg et 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement (ce qui doit être dû sans doute à des différences de composition de la peptone et de la tryptone utilisées dans la constitution du milieu). Aussi tous nos résultats sont exprimés en quantités de cobalamines synthétisées ou détruites par ml de milieu, déduction faite pour chaque expérience des valeurs de cobalamines initiales des cultures témoins.

Les résultats obtenus ne permettent pas d'utiliser a priori la classification systématique pour grouper les bactéries d'après leurs capacités de synthèse. Cette capacité peut être un caractère de genre (Veillonella, Butyribacterium) ou, parfois, seulement un caractère d'espèce. C'est ainsi que les Corynebacterium anaérobies stricts ont un fort pouvoir de synthèse tandis qu'un Corynebacterium aérobie s'est révélé un médiocre producteur. Dans ces conditions nous avons choisi d'exposer les résultats en groupant les souches d'après les genres et en fonction de leurs capacités de synthèse soit pour les cobalamines totales soit pour la cyanocobalamine.

a)- Genres producteurs de cobalamines . Nous réunissons sous cette dénomination 51 souches, appartenant à 10 genres, qui peuvent au moins doubler les quantités de cobalamines totales se trouvant dans le milieu initial. Cela correspond en pratique à une production moyenne d'au moins 3 μg de cobalamines par ml. Le TABLEAU I rapporte pour chaque genre les valeurs extrêmes et la moyenne des

variations en $\mu\text{g/ml}$ des cobalamines et de la vitamine B12. La FIGURE 1 qui établit l'histogramme des variations pour chacune des souches, montre que les genres étudiés ici sont capables de synthèses considérables bien que d'intensité très différente.

- TABLEAU I -

Genres producteurs de cobalamines. Production de cobalamines et de vitamine B12 par ml de milieu de culture

- FIGURE 1 -

Souches productrices de cobalamines. Variations en plus ou moins des teneurs initiales

Le genre Butyribacterium se dégage nettement de tous les autres en donnant les productions les plus fortes tant pour les cobalamines totales que pour la vitamine B12. On peut rapprocher de celui-ci Corynebacterium et Veillonella importants producteurs de cobalamines totales mais aux synthèses de vitamine B12 plus limitées.

On verra aussi dans la FIGURE 1 que Clostridium, genre très composite avec nombre d'espèces à possibilités métaboliques diverses, comprend tantôt des souches à synthèses moyennes portant sur toutes les cobalamines, tantôt des souches effectuant uniquement la synthèse des analogues avec une diminution de la vitamine B12 du milieu, tantôt des souches qui déterminent une diminution des cobalamines totales du milieu.

Chez Ristella on constate qu'un certain nombre de souches accusent un pouvoir de synthèse limité aux analogues autres que la cyanocobalamine.

Pour Bacillus, Endosporus, Sphaerophorus, Welchia et Staphylococcus le nombre limité des souches étudiées ne permet pas de tirer des conclusions quant à la généralité de leurs capacités de synthèse.

En bref, différents microorganismes synthétisent la vitamine B12 dans des proportions plus ou moins grandes par rapport

- TABLEAU I -

Genres producteurs de cobalamines

Production de cobalamines et de vitamine B12 par ml de milieu de culture

Genres	Nombre de souches	<u>Cobalamines totales (µg)</u>			<u>Vitamine B12 (µg)</u>		
		Valeurs extrêmes		Moyenne	Valeurs extrêmes		Moyenne
<u>Butyribacterium</u>	5	+20	+215	+59	+13	+90	+30
<u>Corynebacterium</u>	4	+ 4	+ 36	+22	+ 0,1	+ 2,3	+ 1,5
<u>Veillonella</u>	11	+ 1	+ 32	+14	+ 0,6	+ 4,0	+ 1,8
<u>Bacillus</u>	3	+ 0,1	+ 23	+ 8	+ 0,4	+ 0,5	+ 0,47
<u>Clostridium</u>	13	- 3	+ 20	+ 5	- 0,8	+ 0,9	+ 0,7
<u>Ristella</u>	7	+ 5	+ 26	+14	0	+ 1,9	+ 0,5
<u>Endosporus</u>	4	+ 0,7	+ 13	+ 6	0	+ 0,7	+ 0,4
<u>Sphaeroborus</u>	1		+ 12	-		+ 0,4	-
<u>Welchia</u>	1		+ 9	-		+ 1,6	-
<u>Staphylococcus</u>	2	+ 0,1	+ 6,8	+ 3,4	+ 0,2	+ 1,6	+ 0,9

SOUCHES PRODUCTRICES DE COBALAMINES .

Variations en + ou - des teneurs initiales (moyennes cobalamines 4,5 et vitamine B₁₂ 0,7 mug / ml) .

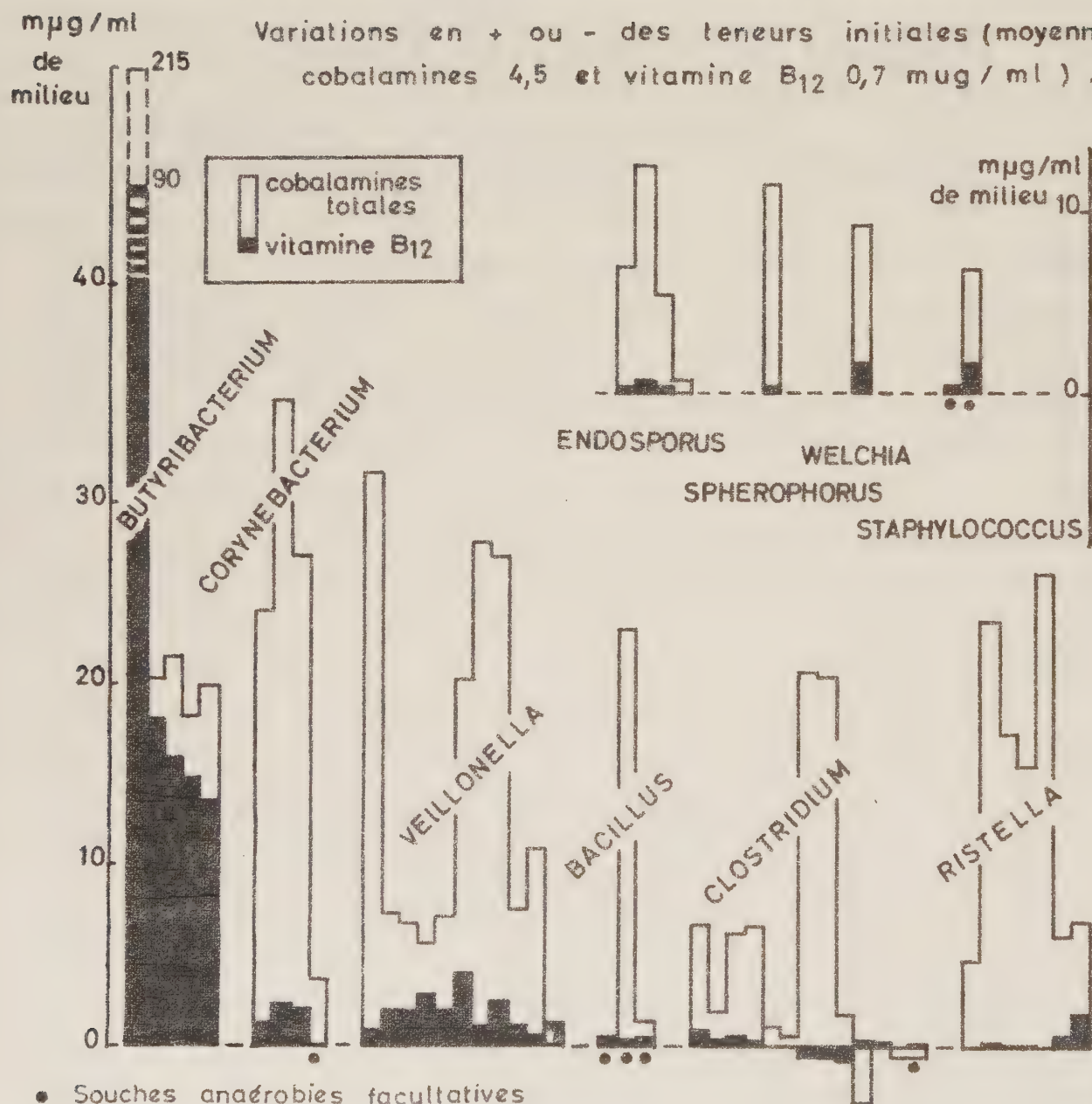


Figure 1

SOUCHES PEU OU NON PRODUCTRICES DE COBALAMINES

Variations en + ou - des teneurs initiales (moyennes cobalamines 4,5 et vitamine B₁₂ 0,7 mug / ml)

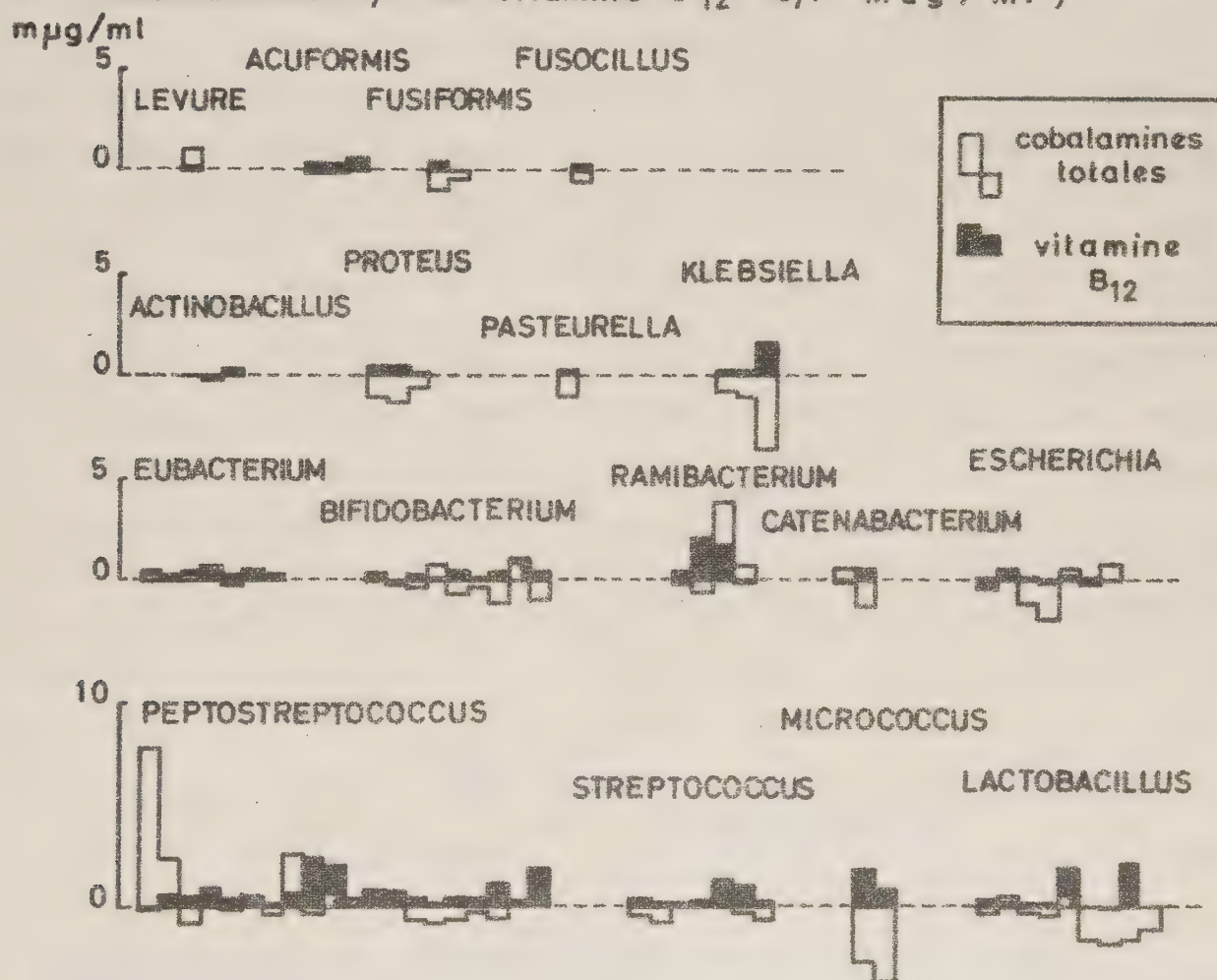


Figure 2

- TABLEAU II -

Genres peu ou non producteurs de cobalamines

Variations des cobalamines ou de la vitamine B12 par rapport aux
teneurs initiales du milieu

Genres	Nombre de souches	Cobalamines (μg)			Vitamine B12 (μg)		
		valeurs extrêmes		moyenne	valeurs extrêmes		moyenne
<u>Pentostreptococcus</u>	20	-0,80	+7,80	+0,56	-0,10	+2,40	+0,68
<u>Streptococcus</u>	7	-0,70	+1,30	-0,09	+0,10	+1,00	+0,42
<u>Micrococcus</u>	2	-2,70	-3,70	-3,20	+0,80	+1,80	+1,30
<u>Lactobacillus</u>	9	-1,90	+0,50	-0,80	-0,10	+1,80	+0,51
<u>Escherichia</u>	7	-1,90	+0,80	-0,30	-0,50	+0,50	+0,04
<u>Eubacterium</u>	7	-0,20	+0,70	+0,21	+0,30	+0,46	+0,37
<u>Bifidobacterium</u>	9	-1,20	+0,90	-0,20	0	+1,00	+0,28
<u>Ramibacterium</u>	4	-0,50	+3,80	+1,00	-0,10	+2,00	+1,00
<u>Catenabacterium</u>	2	-1,35	+0,50	-0,40	-0,10	+0,52	+0,21
<u>Proteus</u>	3	-1,30	-0,70	-1,10	0	+0,40	+0,30
<u>Acuformis</u>	3	-0,10	-0,10	0	+0,30	+0,70	+0,50
<u>Fusifformis</u>	2	-0,90	-0,40	-0,65	0	+0,38	+0,19
<u>Klebsiella</u>	3	-3,70	-0,80	-1,80	+0,06	+1,62	+0,60
<u>Pasteurella</u>	1		-1,00	-		+0,33	-
<u>Fusocillus</u>	1		-0,50	-		+0,30	-
<u>Actinobacillus</u>	3	-0,50	+0,10	-0,17	0	+0,40	+0,23
Levure	1		+1,10	-		+0,15	-
Valeurs extrêmes et moyennes des 84 souches		-3,70	+7,80	-0,15	-0,50	+2,40	+0,51

aux cobalamines totales. Les valeurs du TABLEAU I montrent que la part de la vitamine B12 est, par exemple, d'une moitié pour Butyribacterium tandis que pour les autres genres il est souvent voisin d'un vingtième.

Les possibilités de synthèse n'étaient connues que pour Butyribacterium, Corynebacterium et Clostridium. Les synthèses de cobalamines par d'autres genres sont signalées par nous pour la première fois (147).

Pour conclure nous remarquerons que dans l'ensemble ces souches sont anaérobies strictes. Font exception les genres Bacillus, Staphylococcus, une souche de Corynebacterium et une souche de Clostridium signalées dans la FIGURE 1. Ces deux derniers anaérobies facultatifs produisent d'ailleurs peu ou pas de cobalamines.

b)- Genres peu ou non producteurs de cobalamines .Nous avons trouvé 84 souches , appartenant à 18 genres, qui présentent peu ou pas de synthèses de cobalamines totales. Les variations positives ou négatives des teneurs en cobalamines et en vitamine B12 du milieu pour chaque souche cultivée sont représentées dans la FIGURE 2. Les valeurs extrêmes et les moyennes de ces variations sont données dans le TABLEAU II.

- FIGURE 2 -

Souches peu ou non productrices de cobalamines. Variations en plus ou moins des teneurs initiales

- TABLEAU II -

Genres peu ou non producteurs de cobalamines. Variations de la vitamine B12 par rapport aux teneurs initiales du milieu

Pour ce qui est des cobalamines totales, plus de la moitié des souches étudiées (55 souches, soit 65 p.100) ne possèdent aucun pouvoir de synthèse et, même, les teneurs du milieu diminuent pour 49 d'entre elles. Pour les autres souches on note

une certaine aptitude à la synthèse mais de très faible amplitude à l'exception d'une souche de Peptostreptococcus que nous n'avons pas voulu séparer de ses congénères. Si tant est qu'on puisse établir une moyenne générale des aptitudes synthétisantes ou des effets destructeurs nous obtenons une diminution moyenne de $-0,15 \mu\text{g/ml} \pm 0,17$ (σ_m = erreur-type de la moyenne); nous ne pouvons donc dégager aucune tendance générale de ces souches non productrices.

Il n'en est pas de même pour ce qui est de la vitamine B12. Si nous observons les modifications des teneurs du milieu nous constatons dans une grande majorité des cas (71 souches, soit 85 p.100) une nette augmentation de cette vitamine qui sans atteindre le niveau des souches les plus productrices est souvent du même ordre de grandeur (comparer les colonnes noires des FIGURES 1 et 2 qui sont à la même échelle). Pour mieux montrer la tendance générale à une synthèse de vitamine B12 chez les souches non productrices d'autres cobalamines nous avons dans la FIGURE 3, représenté isolément les mêmes valeurs de vitamine B12 que dans la FIGURE 2, à une échelle double de celle-ci. La moyenne générale pour la vitamine B12 s'établit à $0,51 \mu\text{g/ml} \pm 0,06$ (*).

- FIGURE 3 -

Souches peu ou non productrices de cobalamines. Biosynthèses de vitamine B12 en $\mu\text{g/ml}$.

CONCLUSION -

Parmi les genres étudiés il faut distinguer des souches grandes productrices de cobalamines totales et des souches dénuées d'aptitudes synthétisantes pouvant même être consommatrices. Comme exemple du premier type on peut citer les genres Butyribacterium, Corynebacterium et Veillonella (FIGURE 1) et pour le second type les genres Lactobacillus, Micrococcus, Proteus et Klebsiella (FIGURE 2).

(*)- Il paraît évident que si l'intervalle de confiance (risque $P = 0,05$) de la moyenne des cobalamines totales ($-0,49, + 0,19$) ne permet pas de conclure à une diminution par contre celui correspondant à la vitamine B12 ($+ 0,39, + 0,63$) indique qu'il y a une augmentation significative.

SOUCHES PEU OU NON PRODUCTRICES DE COBALAMINES

Biosynthèses de vitamine B₁₂ en µg/ml

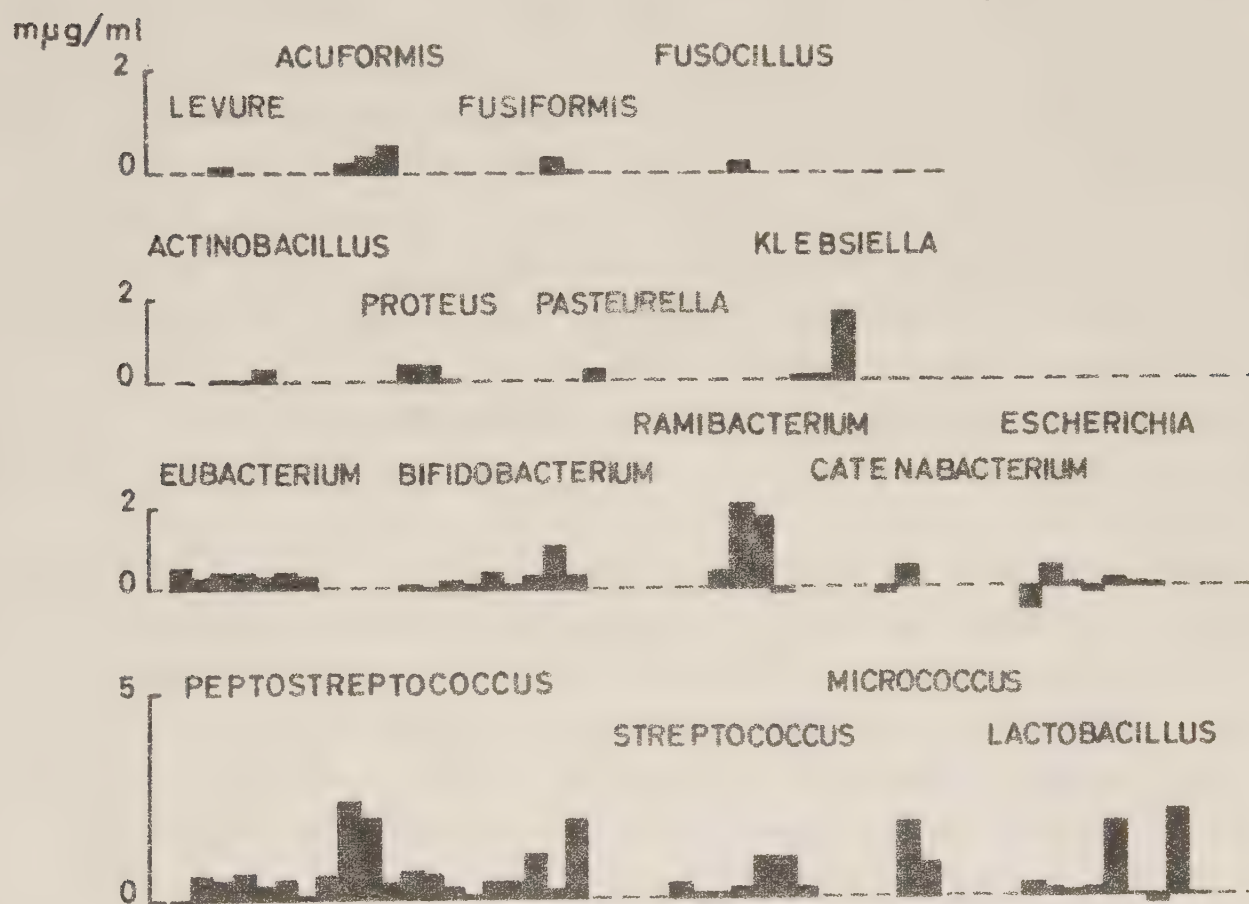


Figure 3

Cette distinction n'est plus valable si l'on considère la synthèse de vitamine B12 : même les souches consommatrices de cobalamines totales sont capables d'élaborer la vitamine B12 avec une intensité plus ou moins marquée. Nous avons été frappés par le fait que les quantités de vitamine B12 synthétisée sont toujours inférieures aux quantités de cobalamines initiales du milieu (moyenne 7 $\mu\text{g/ml}$) : il paraît donc logique de penser que les microorganismes isolés de l'intestin du Rat sont capables de réaliser des interconversions et notamment de transformer les analogues cobalamines en vitamine B12 active. Il semble qu'il s'agit là d'une propriété générale et que la synthèse de vitamine B12 peut être faite par toutes les bactéries étudiées soit directement soit, plus probablement, à partir des cobalamines initiales du milieu.

2)- Influence de certaines conditions de culture et types de fermentation .

a)- Etude des souches anaérobies facultatives . La presque totalité des souches bonnes productrices de cobalamines que nous avons étudiées fait partie de la catégorie des anaérobies stricts. Il était logique de se demander si l'anaérobiose conditionne ou favorise ces synthèses : nous avons donc cultivé, en présence ou absence d'air, les quelques souches anaérobies facultatives faisant partie des genres bon producteurs de cobalamines et un certain nombre d'autres souches peu ou non productrices. Pour certaines d'entre elles la culture a été répétée après les délais plus ou moins longs pouvant aller jusqu'à plusieurs mois; de ce fait leur activité de synthèse n'était pas toujours similaire à celle observée après un isolement récent ; il y a eu au total 32 cultures aérobies et autant anaérobies pour un ensemble de 18 souches.

Les conditions de culture ont été précédemment décrites (emploi d'erlenmeyers pour les cultures aérobies).

La FIGURE 4 indique les variations des teneurs en cobalamines et vitamine B12 du milieu de culture avec une échelle

d'ordonnées deux fois plus grande que dans les FIGURES 1 et 2. Lorsqu'une souche a été testée deux ou plusieurs fois, la culture la plus récente après l'isolement correspond à la première colonne de gauche. Par ailleurs, dans le TABLEAU III, qui ne mentionne que les cobalamines totales, nous donnons les numéros des souches lorsqu'un genre a fait l'objet de plusieurs cultures.

- FIGURE 4 -

Synthèses ou destructions des cobalamines chez les anaérobies facultatifs

- TABLEAU III -

Variations des cobalamines totales (en $\mu\text{g/ml}$) du milieu de culture chez des anaérobies facultatifs

Dans le cas des anaérobies facultatifs, la présence d'oxygène exerce une influence cohérente : dans 29 expériences sur 32, en effet, la présence d'air permet à la culture soit une synthèse accrue soit une diminution moins importante des cobalamines du milieu. La différence positive observée en moyenne est de $+ 1,8 \mu\text{g/ml} \pm 0,4 (*)$. La FIGURE 5, qui exprime ces différences montre bien le sens de l'influence de l'aérobiose pour les cobalamines totales.

- TABLEAU IV -

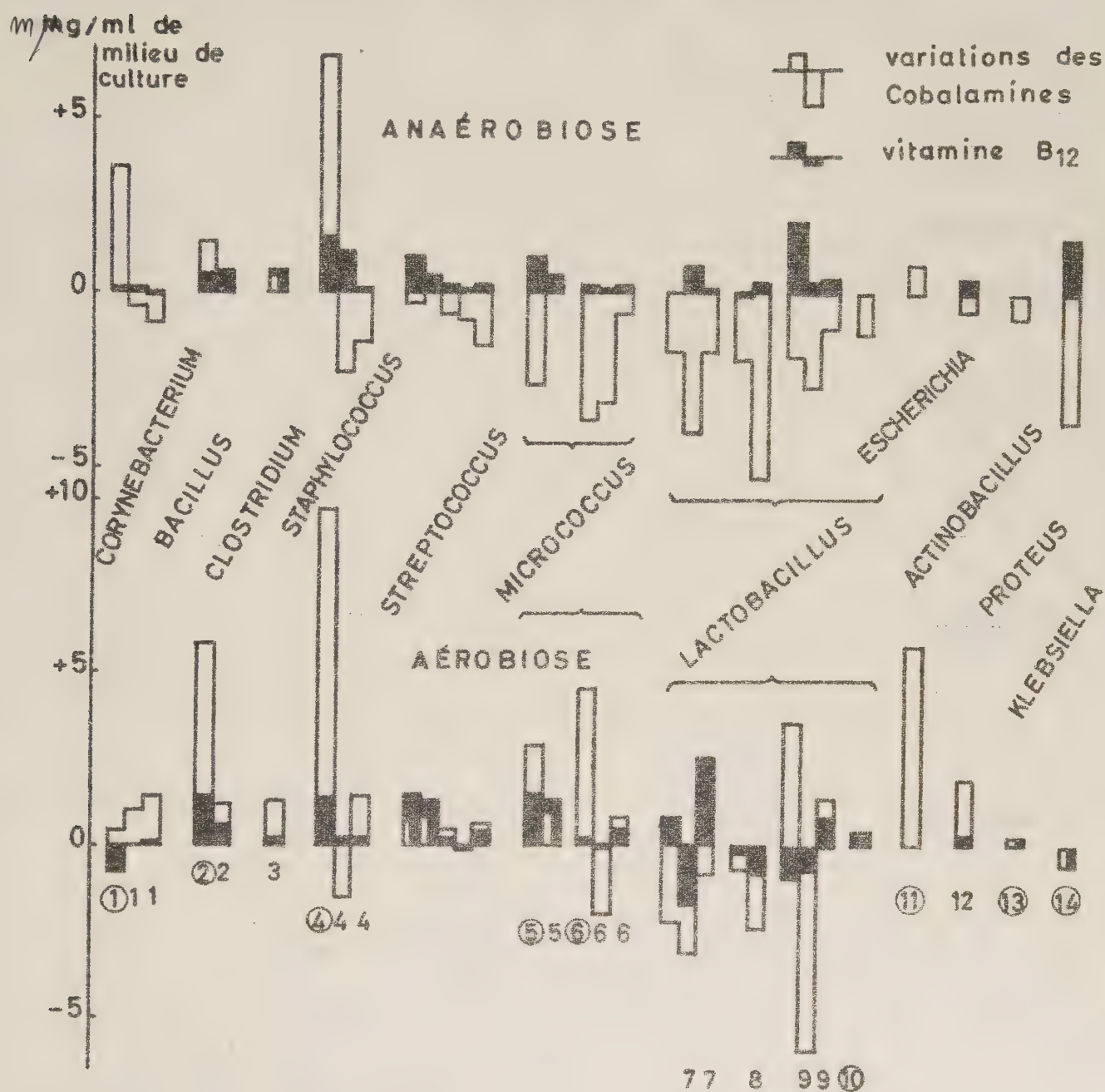
Variations de la vitamine B12 (en $\mu\text{g/ml}$) du milieu de culture chez des anaérobies facultatifs

- FIGURE 5 -

Cultures d'anaérobies facultatifs. Différences dues à l'aérobiose

Les résultats concernant la vitamine B12 (TABLEAU IV et FIGURE 5) ne révèlent aucune influence favorisante de l'aérobiose qui, dans certains cas, provoque même une destruction de la cyanocobalamine qu'on ne voit pas en anaérobiose (comparer pour l'anaérobiose et l'aérobiose les variations en diminution dans le TABLEAU IV). La FIGURE 5 montre que sous l'effet de l'aérobiose les variations (*) - Il s'agit de cultures de genres différents mais soumis à des conditions strictement semblables. L'intervalle de confiance $(+1,0, +2,6)$ est significatif pour $P = 0,05$.

SYNTHÈSES OU DESTRUCTIONS DES COBALAMINES CHEZ LES ANAÉROBIES FACULTATIFS .



1 - 14 - Souches cultivées pour produire
des acides gras volatils .

① - ⑭ - récemment isolées .

Figure 4

Variations des cobalamines totales (en $\mu\text{g/ml}$) du milieu de culture chez
des anaérobies facultatifs

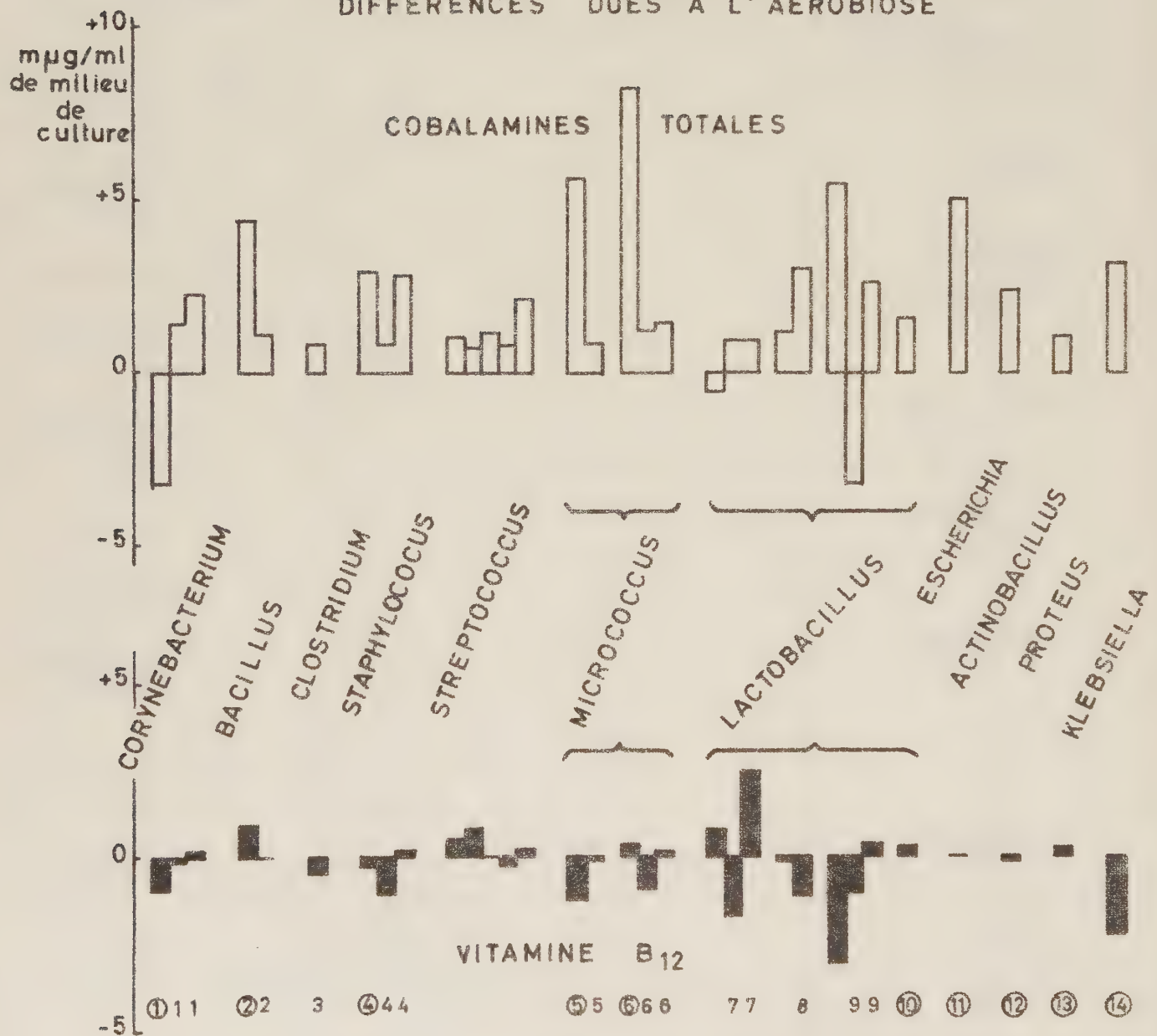
Genres et souches	Anaérobiose	Aérobiose	Différences dues à l'aérobiose
<u>Corynebacterium</u>	+ 3,6	+ 0,4	- 3,2
363-29	- 0,4	+ 1,0	+ 1,4
	- 0,9	+ 1,4	+ 2,3
<u>Bacillus</u>	+ 1,4	+ 5,8	+ 4,4
1x0x712	+ 0,1	+ 1,2	+ 1,1
<u>Clostridium</u>	+ 0,5	+ 1,3	+ 0,8
	+ 6,8	+ 9,7	+ 2,9
<u>Staphylococcus</u>	- 2,3	- 1,5	+ 0,8
	- 1,4	+ 1,4	+ 2,8
<u>Streptococcus</u>	- 0,3	+ 0,7	+ 1,0
42-10	+ 0,1	+ 0,8	+ 0,7
1x0x913	- 0,6	+ 0,5	+ 1,1
363-44	- 0,8	0	+ 0,8
	- 1,5	+ 0,6	+ 2,1
<u>Micrococcus</u>	- 2,7	+ 2,9	+ 5,6
363-30	+ 0,1	+ 0,9	+ 0,8
	- 3,7	+ 4,5	+ 8,2
211-2	- 3,2	- 2,0	+ 1,2
	- 0,6	+ 0,8	+ 1,4
<u>Lactobacillus</u>	- 1,7	- 2,2	- 0,5
313	- 4,0	- 3,1	+ 0,9
	- 1,7	- 0,8	+ 0,9
320	- 1,9	- 0,7	+ 1,2
	- 5,4	- 2,4	+ 3,0
341	- 1,8	+ 3,6	+ 5,4
	- 2,7	- 5,9	- 3,2
	- 1,0	+ 1,4	+ 2,6
H - 152	- 1,2	+ 0,4	+ 1,6
<u>Escherichia</u>	+ 0,8	+ 5,8	+ 5,0
<u>Actinobacillus</u>	- 0,5	+ 1,9	+ 2,4
<u>Proteus</u>	- 0,7	+ 0,3	+ 1,0
<u>Klebsiella</u>	- 3,7	- 0,6	+ 3,1
Moyenne des 32 cultures	- 1,0	+ 0,9	+ 1,8

- TABLEAU IV -

Variations de la vitamine B12 (en µg/ml) du milieu de culture chez
des anaérobies facultatifs

Genres et souches	Anaérobiose	Aérobiose	Différences dues à l'aérobiose
<u>Corynebacterium</u>			
363-29	+ 0,1	- 0,6	- 0,9
	+ 0,1	0	- 0,1
	- 0,1	+ 0,1	+ 0,2
<u>Bacillus</u>			
1x0x712	+ 0,5	+ 1,4	+ 0,9
	+ 0,6	+ 0,6	0
<u>Clostridium</u>	+ 0,6	+ 0,2	- 0,4
<u>Staphylococcus</u>			
419-1	+ 1,6	+ 1,4	- 0,2
	+ 1,2	+ 0,2	- 1,0
	0	+ 0,2	+ 0,2
<u>Streptococcus</u>			
41-1	+ 1,0	+ 1,5	+ 0,5
42-10	+ 0,5	+ 1,3	+ 0,8
1x0x913	+ 0,2	+ 0,2	0
363-44	+ 0,1	- 0,1	- 0,2
	+ 0,2	+ 0,4	+ 0,2
<u>Micrococcus</u>			
363-30	+ 1,8	+ 0,6	- 1,2
	+ 0,5	+ 0,4	- 0,1
	+ 0,8	+ 1,2	+ 0,4
211-2	+ 0,8	- 0,1	- 0,9
	+ 0,7	+ 0,9	+ 0,2
<u>Lactobacillus</u>			
313	0	+ 0,8	+ 0,8
	+ 0,8	- 0,9	- 1,7
	+ 0,1	+ 2,6	+ 2,5
320	- 0,1	- 0,2	- 0,1
	+ 0,3	- 0,8	- 1,1
341	+ 2,1	- 0,9	- 3,0
	+ 0,3	- 0,7	- 1,0
	+ 0,4	+ 0,8	+ 0,4
H - 152	0	+ 0,3	+ 0,3
<u>Escherichia</u>	0	0	0
<u>Actinobacillus</u>	+ 0,4	+ 0,3	- 0,1
<u>Proteus</u>	0	+ 0,3	+ 0,3
<u>Klebsiella</u>	+ 1,6	- 0,6	- 2,2

CULTURES D'ANAÉROBIES FACULTATIFS DIFFÉRENCES DUES À L'AÉROBIOSE



1 - 14 - Souches cultivées pour produire
des acides gras volatils.

① - ⑭ - récemment isolées.

Figure 5

tions en diminution (16 cultures) équivalent presque au nombre des variations en augmentation (13 cultures). On ne saurait donc parler d'une action significative de l'aérobiose sur la vitamine B12 (la moyenne générale des différences $\approx 0,2 \text{ } \mu\text{g/ml} \pm 0,18$ ne permettrait pas non plus de conclure). On peut alors estimer que si l'aérobiose ne provoque pas d'augmentation de la vitamine B12 concomitante à celle très nette des cobalamines totales c'est que l'augmentation de ces dernières porte sur des analogues différents de la cyanocobalamine.

En résumé, le pouvoir de synthèse des cobalamines totales semble nettement favorisé par l'aérobiose chez les anaérobies facultatifs. C'est là un résultat un peu inattendu si nous nous reportons pour comparaison aux synthèses considérables des anaérobies stricts. Avant de conclure nous devons faire quelques réserves sur l'importance de l'aérobiose de nos cultures. Nous avons voulu dans un cas nous assurer d'une aérobiose certaine en agitant les erlenmeyers de la culture de Bacillus et avons trouvé alors que la synthèse habituelle "aérobie" des cobalamines avait complètement disparu. Ce résultat amène à penser que nos conditions de culture habituelles ne réalisent pas une aérobiose complète laquelle ne serait pas la plus favorable aux synthèses étudiées. L'étude de l'obtention d'une synthèse maximale n'est ici qu'ébauchée ; il faudrait savoir dans quelle mesure le maximum de synthèse est lié au maximum de croissance des populations microbiennes suivant que les souches sont à tendance anaérobie, aérobie ou micro-aérophile.

b)- Production d'acides gras volatils. Rapport avec la synthèse des cobalamines -

Anaérobies stricts - Si les capacités de synthèse intense des cobalamines par Veillonella n'étaient pas connues, la capacité de ce genre à produire de l'acide propionique avait été signalée(198); on ne peut manquer de faire le rapprochement avec le pouvoir ferment-

taire des Propionibacterium, microorganismes utilisés dans l'industrie pour leurs aptitudes à synthétiser la vitamine B₁₂ (15, 131). Nous avons ainsi été conduit à étudier les types de fermentation de 29 souches anaérobies strictes appartenant à 9 genres et de 14 souches anaérobies facultatives de 10 genres divers. Ce faisant nous espérons mieux cerner, qu'avec le critère de l'anaérobiose, les liens qui unissent la production de cobalamines et de vitamine B₁₂ au métabolisme principal de la bactérie.

- TABLEAU V -

Production d'acide gras volatils par des souches anaérobies strictes

- FIGURE 6 -

Production d'acides gras volatils par des anaérobies strictes.

Le TABLEAU V montre les limites, inférieure et supérieure, de production de trois acides gras volatils (acides en C₂, C₃ et C₄) par les bactéries anaérobies strictes. On peut en dégager deux types principaux d'activité fermentaire. Un premier groupe formé par Corynebacterium et Vaillonella présente une fermentation à prédominance propionique avec une fermentation acétique notable. Un deuxième groupe comprend les genres Butyribacterium, Clostridium, Ristella, Welchia et Sphaerophorus avec des fermentations butyrique et acétique presque équivalentes (sauf pour le dernier cité). Echappent à cette classification : une culture de Bifidobacterium, qui présente une fermentation essentiellement acétique, ainsi qu'une souche de Peptostreptococcus tandis que 12 autres souches de ce dernier genre ont des fermentations pratiquement nulles. Nous avons représenté les productions des 3 acides pour chacune des cultures dans la FIGURE 6. Pour simplifier, on peut dire que les anaérobies stricts étudiés présentent des fermentations soit de type propionique, soit de type butyrique, étant entendu que presque dans tous ces cas les accompagne une notable production d'acide acétique.

Anaérobies facultatifs - Ont été étudiées 14 souches dont 2 (Bacillus et Staphylococcus) étaient bonnes productrices de cobalamines

- TABLEAU V -

Production d'acides gras volatils par des souches anaérobies strictes

Genres	Nombre de		Valeurs extrêmes en µg/ml		
	souches	cultures	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique
<u>Corynebacterium</u>	3	5	<u>50 - 300</u>	<u>600 - 2000</u>	<u>≤ 100</u>
<u>Veillonella</u>	5	15	<u>100 - 900</u>	<u>300 - 2000</u>	<u>≤ 20</u>
<u>Butyribacterium</u>	1	5	<u>0 - 1100</u>	0 - 300	<u>60 - 750</u>
<u>Clostridium</u>	2	3	<u>50 - 200</u>	<u>≤ 50</u>	<u>150 - 250</u>
<u>Ristella</u>	2	3	<u>100 - 250</u>	<u>≤ 50</u>	<u>0 - 250</u>
<u>Welchia</u>	1	1	<u>250</u>	0	<u>400</u>
<u>Sphaerophorus</u>	1	1	0	70	<u>300</u>
<u>Peptostreptococcus</u>	12	12	0	<u>≤ 50</u>	<u>≤ 50</u>
	1*	2	<u>250 - 400</u>	50 - 100	0 - 80
<u>Bifidobacterium</u>	1	1	<u>790</u>	70	20

(*) souche 1x0x914 qui présente des productions inhabituelles pour ce genre
 Les productions prédominantes sont soulignées

PRODUCTION D'ACIDES GRAS VOLATILS PAR DES ANAÉROBIES STRICTS .



Figure 6

totales (FIGURE 1), les autres étant médiocres productrices (FIGURE 2 pour la plupart et FIGURE 1 pour Clostridium et Corynebacterium). Nous avons pratiqué 22 doubles cultures en aérobiose et anaérobiose dans les conditions indiquées précédemment.

Les résultats des cultures pour les 10 genres étudiés montrent que les productions d'acides gras volatils sont très supérieures pour les cultures en aérobiose (TABLEAU VI). Il est aisé de constater qu'à l'exception de Clostridium et de Corynebacterium les cultures aérobies présentent des valeurs beaucoup plus fortes : pour Clostridium la culture aérobie est également supérieure pour la production d'acide acétique.

- TABLEAU VI -

Production d'acides gras volatils par des souches anaérobies facultatives

Nous avons souligné d'un trait plein les valeurs les plus élevées dans la comparaison anaérobie-aérobie des cultures.

On peut, remarquer aussi que chez les anaérobies facultatifs, contrairement aux anaérobies stricts, la production d'acide acétique est prédominante, souvent même isolée. La souche de Corynebacterium est la seule à ne pas présenter de synthèse acétique. On note des fermentations propionique et butyrique souvent nulles sauf pour Bacillus qui montre une synthèse concomitante notable d'acide acétique. A signaler, enfin, une fermentation propionique assez importante dans une seule culture de Staphylococcus ainsi que dans une culture de Micrococcus.

La production d'acides gras volatils est, pour une même souche, constamment plus élevée avec la culture de souche fraîchement isolée (voir TABLEAU VI) ce qui est en accord comme nous le disions au début de cette étude avec l'affaiblissement des facultés de synthèse des cobalamines en fonction de la durée de conservation des souches.

- Comparaison des synthèses d'acides gras et de cobalamines. De prime abord nous pouvons souligner que les fermentations propionique ou butyrique sont le fait des principaux genres représentés dans le groupe des producteurs de cobalamines (FIGURE 1) et en particulier des anaérobies stricts (Veillonella, Corynebacterium, Butyribacterium, Clostridium, Welchia, Sphaerophorus). Cependant tous les genres n'ont pu être analysés au point de vue de leur production d'acides gras volatils: parmi les anaérobies stricts nous n'avons pas été en mesure de tester le comportement de Endosporus. En outre, la plupart des souches étudiées pour leur capacité de production d'acides gras volatils ne provenaient pas d'un isolement récent; donc leurs synthèses de cobalamines, bien qu'appréciables ne présentaient pas leurs valeurs maximales.

Si nous considérons les aptitudes des souches dans leur ensemble et non le détail de chaque culture, nous pensons pouvoir établir une correspondance assez générale entre le type des fermentations propionique ou butyrique, et les capacités de synthèse des cobalamines-B₁₂ des souches anaérobies strictes (FIGURES 1 et 6). En effet, les autres anaérobies stricts testés peu producteurs de cobalamines (Peptostreptococcus et Bifidobacterium), n'ont que des fermentations minimales ou à prédominance nettement acétique (FIGURES 2 et 6).

Chez les anaérobies facultatifs, la comparaison a pu être réalisée en grande partie avec des souches récemment isolées dont les variations correspondantes en cobalamines et vitamine B₁₂ sont représentées dans la FIGURE 4. Il suffit de comparer les valeurs du TABLEAU VI avec celles exprimées dans la FIGURE 4 pour voir qu'il y a concordance entre une production élevée d'acide acétique et l'intensité des synthèses de cobalamines totales des "premières" cultures de Bacillus, Staphylococcus, Micrococcus 363-20 (souche n°5 dans la FIGURE 4) et Escherichia. La synthèse des cobalamines est plus faible chez Lactobacillus (souche 10, FIGURE 4) et Proteus, tandis que Klebsiella montre, en aérobiose, une production d'acide acétique

Production d'acides gras volatils par des souches anaérobies facultatives

Genres	Nombre de souches cultures		Acide acétique en $\mu\text{g/ml}$	Acide propionique en $\mu\text{g/ml}$	Acide butyrique en $\mu\text{g/ml}$
<u>BACILLUS</u>	1				
anaérobiose		2	0	20	50
aérobiose		2	180 - 1100 *	200 - 220	370 - 390
<u>STAPHYLOCOCCUS</u>	1				
anaérobiose		3	0 - 90	0	0 - 20
aérobiose		3	30 - 360 **	5 - 700 *	0 - 30
<u>MICROCOCCUS</u>	2				
63-20 { anaérobiose		2	40 - 50	0 - 18	0 - 30
{ aérobiose		2	270 - 1600 *	0	0 - 20
11-2 { anaérobiose		3	20 - 100	0	0
{ aérobiose		3	460 - 1600 **	0 - 640 *	0
<u>LACTOBACILLUS</u>	4				
anaérobiose		6	0 - 60	0	0 - 7
aérobiose		6	30 - 450 *	0 - 40 *	0 - 9
<u>ESCHERICHIA</u>	1				
anaérobiose		1	430	0	0
aérobiose		1	1330 *	0	0
<u>ACTINOBACILLUS</u>	1				
anaérobiose		1	0	4	0
aérobiose		1	60	0	0
<u>PROTEUS</u>	1				
anaérobiose		1	300	6	0
aérobiose		1	800 *	30 *	0
<u>KLEBSIELLA</u>	1				
anaérobiose		1	75	5	0
aérobiose		1	600 *	25 *	0
<u>CLOSTRIDIUM</u>	1				
anaérobiose		1	130	20	190
aérobiose		1	240	0	180
<u>CORYNEBACTERIUM</u>	1				
anaérobiose		1	0	18	14
aérobiose		1	0	8	7

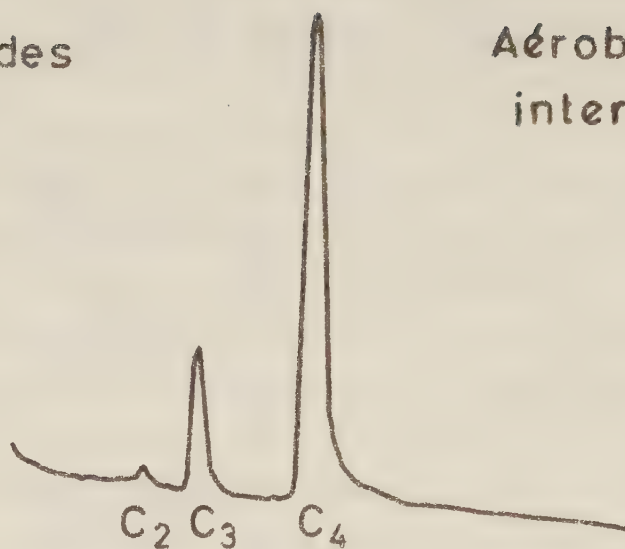
* valeur la plus forte correspondant à une "oremière" culture (souche récemment isolée, fig. 4)

** valeur forte d'une "dernière" culture (souche 4 et 6 de la fig. 4)

Production d'acides
gras volatils
par Bacillus

Aérobiose
intense

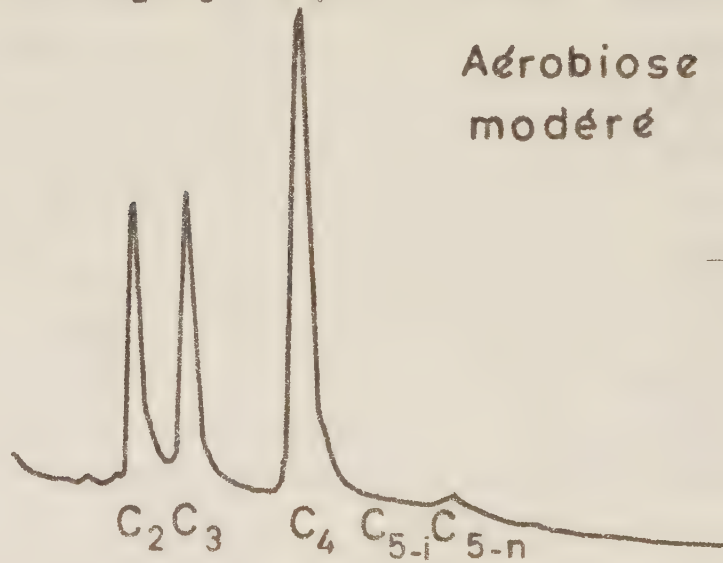
Souche 1x0x712



Aérobiose
modéré

Substrat glucose
incubation 4 jours

Injection 1 μ l



Anaérobiose

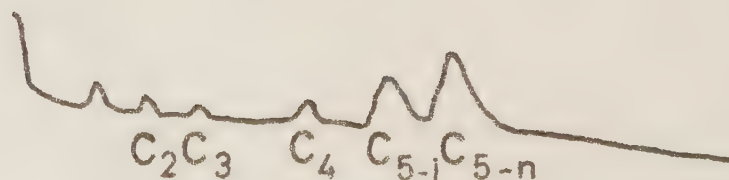


Figure 7

accompagnée seulement d'une nette épargne des cobalamines du milieu. Une autre correspondance se retrouve entre les synthèses des cobalamines et de l'acide propionique de la "première" culture de Staphylococcus et de Micrococcus 211-2, en aérobiose (souche 6, FIGURE 4).

Les fortes productions d'acide acétique des "dernières" cultures de Staphylococcus et surtout de Micrococcus 211-2 (voir TABLEAU VI) coïncident avec la réapparition d'une synthèse de cobalamines totales en aérobiose (souches 4 et 6 de la FIGURE 6). Enfin chez Lactobacillus les "dernières" cultures des souches 7 et 9 (FIGURE 4) présentent par rapport aux précédentes des teneurs plus fortes en cobalamines et il en est de même pour l'acide acétique(*).

Comme il a été dit ci-dessus les synthèses "aérobies" importantes de cobalamines disparaissent si nous agitions l'erlenmeyer servant à la culture tout le long de l'incubation. On réalise ainsi une sorte d'aérobiose forcée qui est moins propice à la synthèse des cobalamines et nous en avons déduit que le type d'aérobiose le plus favorable est réalisé par une aération plutôt limitée. Nous présentons dans la FIGURE 7 des tracés de chromatographie gazeuse comparant la production d'acides gras volatils de cette même souche de Bacillus : on remarquera que les acides acétique et propionique sont aussi très diminués par l'agitation de la culture. On notera aussi que l'anaérobiose donne une tendance à produire des acides à chaîne plus longue (184).

- FIGURE 7 -

Production d'acides gras volatils par Bacillus

Peut-on penser que les plus grosses productions sont liées à une croissance cellulaire plus importante, elle-même assurée par une "teneur" optimale en oxygène libre ? De façon géné-

(*)- Nous voudrions noter ici qu'il n'y a pas interférence des acides gras volatils sur le dosage des cobalamines. En effet, nous avons vérifié que la présence de quantités d'acides gras volatils similaires à celles produites dans nos cultures ne perturbe en aucune façon les dosages par Escherichia coli ou par Ochromonas malhamensis.

rale, l'importance de la croissance cellulaire ne peut être niée. Pour les cultures comparées de Bacillus la croissance cellulaire semble bien plus intense dans les erlenmeyers non agités. Mais nombre de microorganismes, appartenant à des genres capables d'effectuer les biosynthèses de cobalamines, présentent des croissances cellulaires importantes avec des productions nulles ou minimales de cobalamines-B₁₂ ainsi que d'acides volatils (Peptostreptococcus par exemple).

En résumé , bien qu'on ne puisse établir de parallélisme entre les fermentations butyrique ou propionique et les synthèses de cobalamines et vitamine B₁₂, les aptitudes à la production importante de ces deux types de substances coexistent chez les mêmes anaérobies stricts.

Les deux phénomènes peuvent être liés sans qu'il y ait pour autant concordance dans le temps. Nous avons constaté nous-mêmes que les cobalamines augmentent sensiblement en même temps que la densité des populations , sauf dans des cultures vieilles. Qu'en est-il pour la production d'acides gras volatils ?

- FIGURE 8 -

Evolution de la production d'acides gras volatils.
Cultures de 1-6 jours

La FIGURE 8 représente l'évolution de cette production suivant la durée de l'incubation pour un certain nombre de souches anaérobies strictes. Les cultures de Veillonella et Butyribacterium ont été suivies jour par jour jusqu'à l'arrêt de l'incubation; les cultures de Clostridium, Welchia, et Peptostreptococcus n'ont fait l'objet que de sondages pour différentes durées d'incubation. L'acide propionique peut être produit de façon importante dès le 1er jour de l'incubation; l'acide butyrique par contre a tendance à s'accumuler en fin de culture, voire même à n'apparaître qu'avec un certain temps de latence (Butyribacterium). Il est clair qu'il ne peut y avoir de corrélation dans le sens d'une correspondance quantitative entre les deux types de production. Par ailleurs nous

ÉVOLUTION DE LA PRODUCTION D'ACIDES GRAS VOLATILS .
CULTURES DE 1-6 JOURS

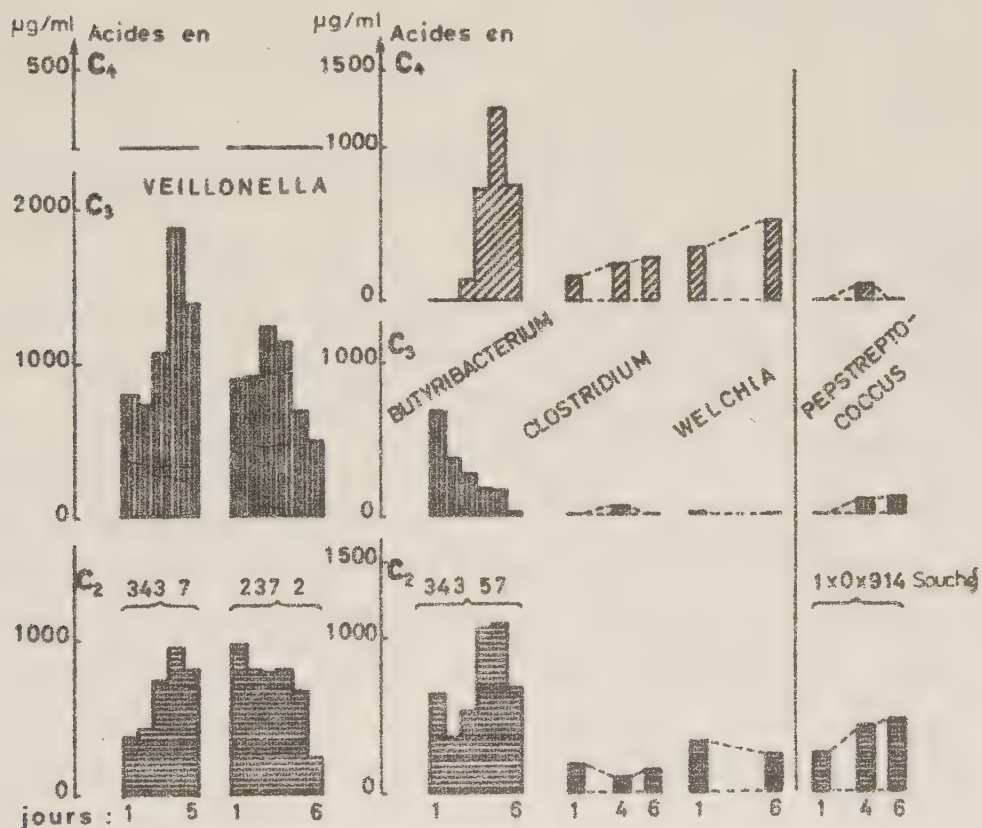


Figure 8

noterons l'intensité du pouvoir fermentaire de Butyribacterium, qui s'étend aux trois acides avec dans une première phase une fermentation de type acéto-propionique suivie d'une fermentation à prédominance acéto-butyrique (il ne paraît pas impossible que l'acide propionique tout d'abord produit soit réutilisé par la bactérie aux fins d'un nouveau travail métabolique). Nous croyons qu'il faut mettre en rapport l'intense métabolisme de cette bactérie avec ses hautes capacités de production de cobalamines et de vitamine B12 sans pour autant faire correspondre, culture par culture, cette capacité avec la production d'acides volatils.

c)- Influence du substrat énergétique .

Les sources glucidiques utilisables in vivo par les microorganismes sont très diverses. La présence dans l'intestin du Rat, de Lactobacillus et autres microorganismes donnant de l'acide lactique nous a incités à étudier l'action de cette substance par comparaison au glucose. On sait d'autre part que l'acide lactique est un métabolite représentant une étape intermédiaire dans la dégradation du glucose aboutissant au cycle de KREBS puis à l'acide propionique. Il nous a paru intéressant de voir si l'acide lactique métaboliquement plus proche de l'acide propionique que le glucose, favorise la production d'acides volatils par les principaux producteurs de cobalamines : Veillonella, Corynebacterium et Butyribacterium .

L'acide pyruvique n'est pas connu comme un produit abondant du métabolisme microbien mais il est considéré comme une étape importante de la dégradation du glucose, et, en ce sens comme un précurseur de l'acide succinique; nous avons étudié également son action sur la biosynthèse des cobalamines et sur les fermentations de Veillonella et Corynebacterium.

- acide lactique . Dans une note préliminaire à ce travail (184) nous avons montré que l'acide lactique détermine une synthèse accrue de cobalamines-B12 ainsi qu'une augmentation dans la production d'acide propionique par Veillonella. Nous donnons ici les résultats complets pour 13 cultures.

Le TABLEAU VII indique les teneurs du milieu en cobalamines-B12 et en acides gras volatils selon que diverses souches de Veillonella se développent sur glucose ou sur acide lactique (à raison de deux molécules d'acide lactique pour une molécule de glucose). Pour les 13 cultures comparées de 5 souches différentes la substitution d'acide lactique au glucose conduit à une forte augmentation des cobalamines totales, de la vitamine B12 et de l'acide propionique; un seul cas fait exception pour les cobalamines totales, la première culture de la souche RI 31-4. Généralement l'acide acétique est augmenté (sauf dans les cultures 3 et 4 de la souche 237-2). La plupart de ces variations sont représentées dans la FIGURE 9 et pour d'autres souches (cultures 3 et 4 des souches 237-2 et RI 31-4) dans la partie supérieure de la FIGURE 12.

- TABLEAU VII -

Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras volatils par des cultures de Veillonella sur substrat glucose ou acide lactique

- FIGURE 9 -

Variations des teneurs du milieu en cobalamines-B12 et en acides gras volatils. Effet de la substitution du glucose par du lactate (Veillonella)

Le TABLEAU VIII résume les résultats comparés des cultures de Corynebacterium et Butyribacterium, autres bons producteurs de cobalamines sur substrat glucose ou acide lactique.

Chez le premier, (Corynebacterium) à fermentation propionique, nous avons étudié deux souches : l'une isolée de l'intestin de Rat, l'autre provenant de la collection de l'Institut Pasteur. Les résultats des 4 doubles cultures sont tout à fait semblables à ceux fournis par Veillonella concernant les cobalamines

- TABLEAU VII -

Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras
volatils par des cultures de Veillonella sur substrat glucose
ou acide lactique

Souche et substrat	Ordre des cultures	Cobalamines totales (en $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Vitamine B12	Acides gras volatils		
				C2	C3 (en $\mu\text{g}/\text{ml}$)	C4
343-7 glucose	1 (*)	+ 7,5	+ 1,2	-	non analysés	-
	2	+ 0,6	+ 0,5	0	+ 1279	
	3	- 1,4	+ 1,2	+ 732	+ 1316	
	1 (*)	+ 44,1	+ 24,2	-	non analysés	-
	2	+ 16,0	+ 16,4	+ 928	+ 7125	
	3	+ 5,9	+ 7,1	+ 2773	+ 2745	
237-2 glucose	1	- 1,1	+ 1,9	+ 682	+ 893	
	2	0	+ 1,8	+ 596	+ 1057	+ 22
	(3)	+ 4,6	+ 1,4	+ 300	+ 394	
	(4)	+ 5,4	+ 1,6	+ 289	+ 400	
	1	+ 6,7	+ 10,6	+ 2573	+ 2416	
	2	+ 1,9	+ 3,8	+ 1048	+ 1645	
	(3)	+ 7,4	+ 2,4	0	+ 1930	
	(4)	+ 6,1	+ 2,8	+ 50	+ 2026	
215-4 glucose	1	- 1,7	+ 0,5	+ 343	+ 355	
	1	+ 6,5	+ 8,0	+ 792	+ 1348	+ 173
RI 31-4 glucose	1 (*)	+ 10,8	+ 0,6	+ 249	+ 740	+ 13
	2	+ 70,2	+ 1,8	+ 107	+ 414	
	(3)	+ 1,8	+ 1,2	+ 292	+ 583	
	(4)	+ 0,6	+ 1,5	+ 292	+ 441	
	1 (*)	+ 5,1	+ 0,7	+ 756	+ 1160	
	2	+ 115,0	+ 2,6	+ 680	+ 1156	
	(3)	+ 3,7	+ 1,7	+ 1798	+ 2254	
	(4)	+ 4,8	+ 2,7	+ 1572	+ 2299	
RI 36-1 glucose	1 (*)	+ 1,0	+ 1,4	+ 381	+ 708	
	1 (*)	+ 7,9	+ 2,7	+ 1035	+ 956	

(*) culture avec souche récemment isolée

(3) (4) cultures dont les valeurs sont représentées dans la figure 10

VARIATIONS DES TENEURS DU MILIEU EN COBALAMINES - B₁₂ ET EN ACIDES GRAS VOLATILS.

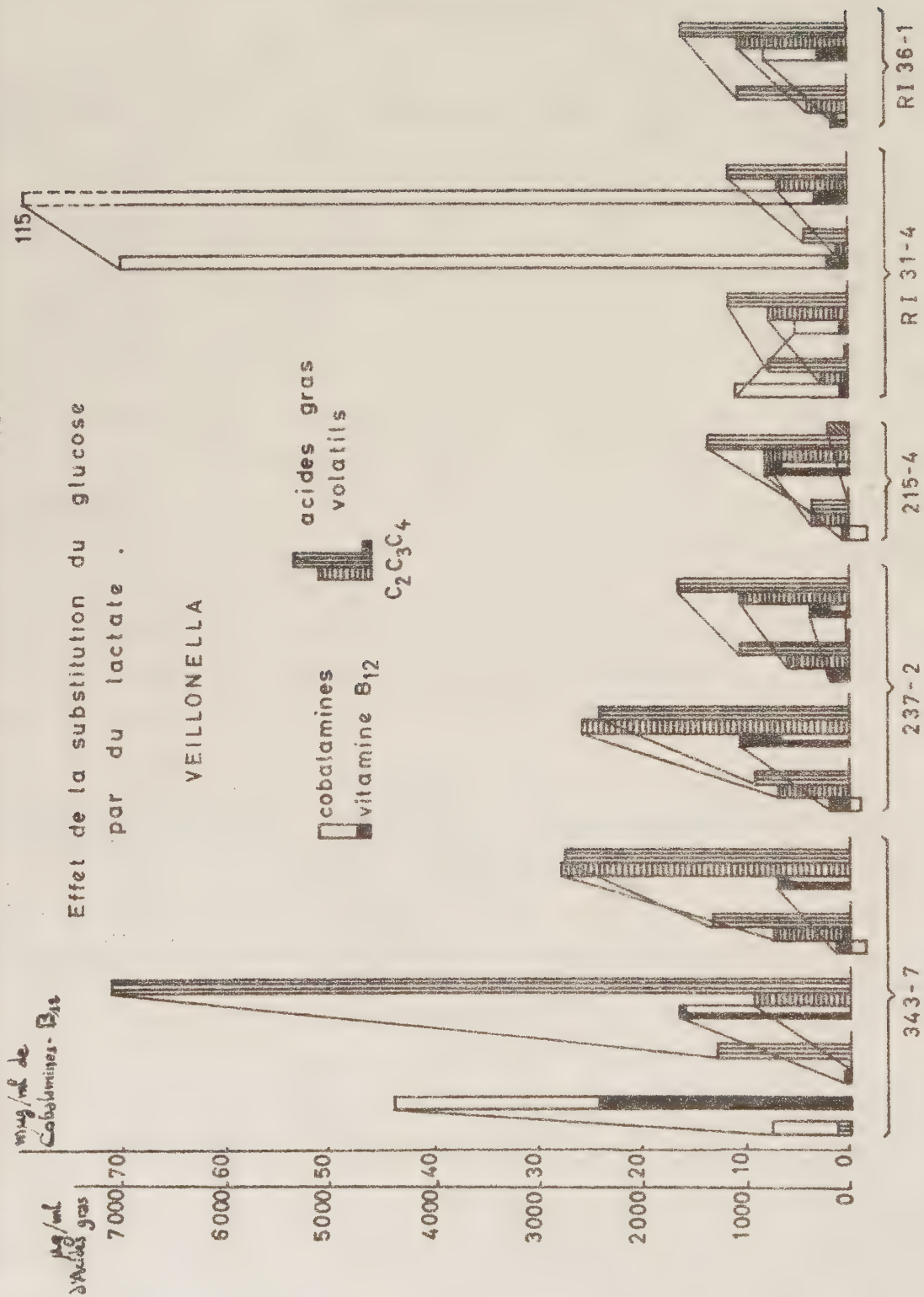


Figure 9

- TABLEAU VIII -

Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras
volatils par des cultures de Corynebacterium ou Butyribacterium
sur substrat glucose ou acide lactique

Genre <u>Corynebacterium</u>						
Souche et substrat	Ordre des cultures	Cobalamines totales (en $\mu\text{g/ml}$)	Vitamine B12 (en $\mu\text{g/ml}$)	Acides gras volatils		
				C2	C3 (en $\mu\text{g/ml}$)	C4
RI 26-3 glucose ac. lactique	1	+ 15,7	+ 1,7	+ 217	+ 569	0
	2	+ 38,9	+ 2,5	+ 285	+ 1128	0
	1	+ 19,2	+ 14,4	+ 398	+ 928	+ 169
	2	+ 44,3	+ 7,4	+ 869	+ 1924	0
Pasteur glucose ac. lactique	1	+ 0,3	+ 2,4	+ 46	+ 441	0
	2	+ 36,4	+ 5,4	+ 13	+ 560	0
	1	+ 22,1	+ 12,6	+ 1046	+ 1800	+ 138
	2	+ 44,3	+ 12,2	+ 318	+ 1277	0
Genre <u>Butyribacterium</u>						
343-57 glucose ac. lactique	1	+ 13,3	+ 13,7	+ 164	+ 59	+ 83
	2	+ 9,8	+ 20,2	0	0	+ 48
	3	+ 14,0	+ 24,6	0	0	+ 56
	1	+ 20,2	+ 17,1	+ 282	+ 83	+ 260
	2	+ 72,5	+ 81,7	+ 1047	+ 247	+ 652
	3	+ 71,9	+ 57,9	+ 542	+ 333	+ 976

VARIATIONS DES TENEURS DU MILIEU EN COBALAMINES - B₁₂ ET EN ACIDES GRAS VOLATILS

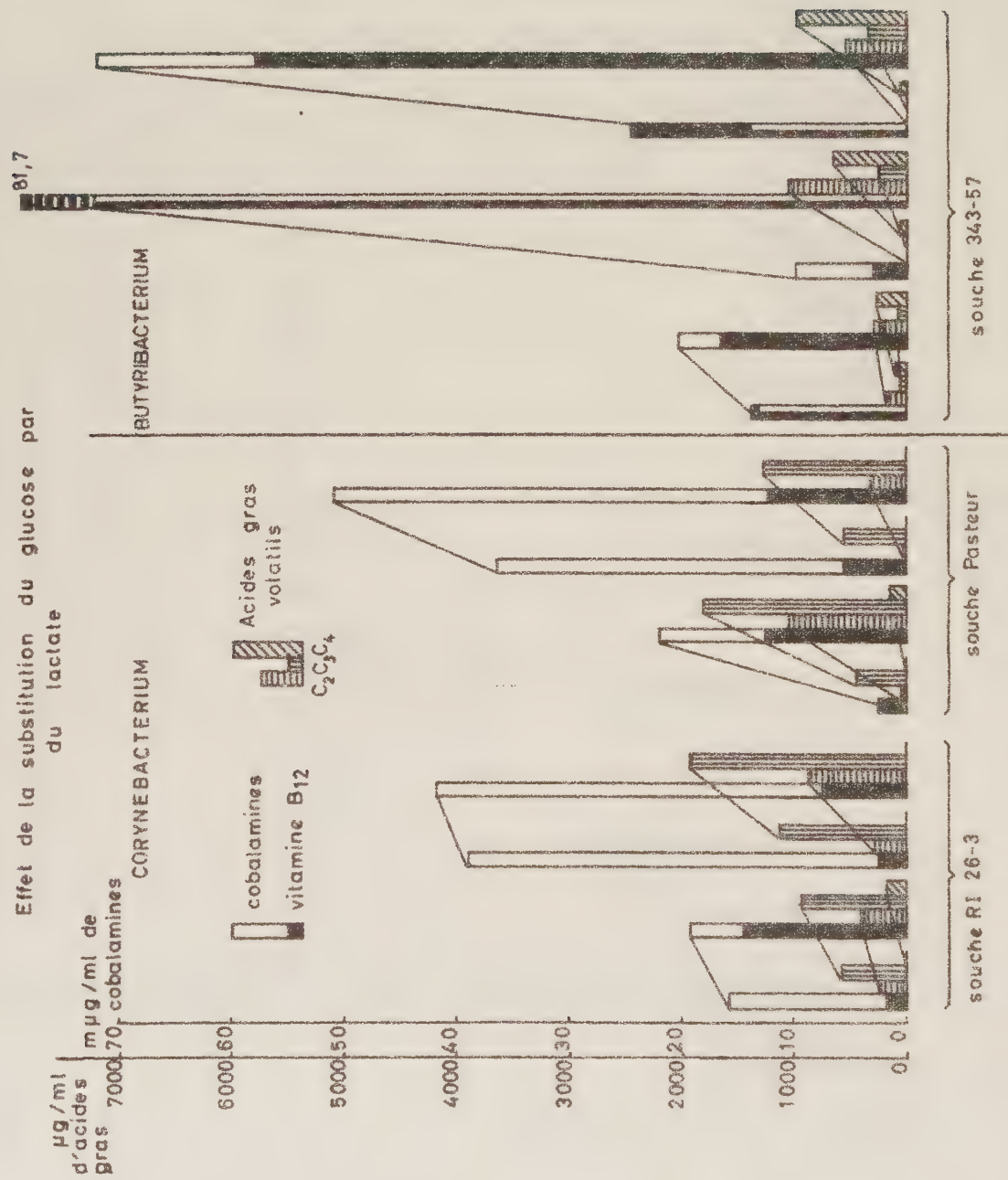


Figure 10

(y compris la vitamine B12) et les acides en C₂ et C₃ sur substrat lactate. L'expression graphique de ces résultats se trouve dans la FIGURE 10. Des résultats analogues sont obtenus avec les trois doubles cultures de la souche 343-57 de Butyribacterium.

- TABLEAU VIII -

Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras volatils par des cultures de Corynebacterium ou Butyribacterium sur substrat glucose ou acide lactique.

- FIGURE 10 -

Variations des teneurs du milieu en cobalamines-B12 et en acides gras volatils. Effet de la substitution du glucose par du lactate (Corynebacterium et Butyribacterium)

En résumé , il ressort des TABLEAUX VII et VIII comme des FIGURES 9 et 10 que l'acide lactique favorise très nettement les synthèses de cobalamines et vitamine B12 et exalte les fermentations de façon très générale. Dans certains cas (Butyribacterium) la synthèse de vitamine B12, en présence d'acide lactique, est souvent plus importante que celle des cobalamines totales. Malgré ces fortes productions des cobalamines et des acides gras volatils déterminées par l'acide lactique on ne peut affirmer la corrélation étroite entre les deux phénomènes du fait de l'absence de proportionnalité dans leurs augmentations respectives.

- acide pyruvique - Qu'en est-il en remplaçant le glucose par l'acide pyruvique, toujours en quantités équivalentes à raison de deux molécules d'acide pyruvique pour une de glucose ? Nous avons fait 8 cultures comparées de 4 souches de Veillonella et 3 cultures de 2 souches de Corynebacterium. Les résultats sont présentés dans le TABLEAU IX, la FIGURE 11 et en partie dans la FIGURE 12 (cultures n° 3 et n° 4). Le nombre de cultures effectuées avec l'acide pyruvique est moins élevé qu'avec l'acide lactique et dans l'ensemble les résultats sont moins cohérents (voir TABLEAU VIII).

- TABLEAU IX -

Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras volatils par des cultures de Veillonella ou de Corynebacterium sur substrat glucose ou acide pyruvique

- FIGURE 11 -

Variations des teneurs du milieu en cobalamines-B12 et en acides gras volatils. Effet de la substitution du glucose par du pyruvate (Veillonella et Corynebacterium)

Les teneurs en vitamine B12 du milieu diminuent toujours chez Veillonella mais non chez Corynebacterium. Par contre les cobalamines totales de Veillonella augmentent (sauf pour les cultures n° 3 et n° 4 de la souche 237-2) et dans ce cas il y a aussi élévation de la production d'acide acétique. Celle-ci augmente toujours chez Corynebacterium tandis que la fermentation propionique reste sensiblement équivalente. La production d'acide propionique est dans l'ensemble beaucoup moins forte que sur le substrat "lactate" (cette différence apparaît nettement à l'examen de la FIGURE 12).

Si , chez Veillonella il y a concomitance entre la synthèse des cobalamines totales, mais non de vitamine B12, et la production d'acide acétique il faut peut-être rapprocher ce fait du phénomène observé dans la culture en aérobiose chez les anaérobies facultatifs. En effet, nous obtenons des effets analogues (augmentation des analogues cobalamines et de la production d'acide acétique) soit en cultivant sur glucose certains anaérobies facultatifs en présence d'oxygène soit en utilisant un substrat pyruvate à la place du glucose comme source énergétique d'un anaérobie strict (Veillonella) . Dans le premier cas, l'acide pyruvique joue peut-être un rôle intermédiaire s'il est produit plus facilement au cours du métabolisme aérobie.

-effet des acides lactique et pyruvique sur la croissance cellulaire . Enfin, nous avons étudié les effets comparés du glucose et des acides lactique et pyruvique sur la croissance des souches

**Variations du milieu en cobalamines-B12 et production d'acides gras
volatils par des cultures de Veillonella ou Corynebacterium
sur substrat glucose ou acide pyruvique**

Genre Veillonella						
Souche et substrat	Ordre des cultures*	Cobalamines totales (en $\mu\text{g/ml}$)	Vitamine B12	Acides gras volatils		
				C2	C3 (en $\mu\text{g/ml}$)	C4
237-2 glucose	2	0	+ 1,8	+ 596	+ 1057	+ 22
	(3)	+ 4,6	+ 1,4	+ 300	+ 394	
	(4)	+ 5,4	+ 1,6	+ 289	+ 400	
	2	+ 1,3	+ <u>1,6</u>	+ 1718	+ <u>889</u>	
	(3)	+ <u>1,8</u>	+ <u>0,6</u>	+ <u>139</u>	+ 794	
	(4)	+ <u>5,3</u>	+ <u>1,4</u>	+ <u>60</u>	+ 942	
215-4 glucose	1	- 1,7	+ 0,5	+ 343	+ 355	
	1	+ 2,2	+ <u>0,3</u>	+ 1839	+ 1216	+ 92
RI 31-4 glucose	2	+ 70,2	+ 1,8	+ 107	+ 414	
	(3)	+ 1,8	+ 1,2	+ 292	+ 583	
	(4)	+ 0,6	+ 1,5	+ 292	+ 441	
	2	+ 110,8	+ <u>1,6</u>	+ 1020	+ 680	
	(3)	+ 2,1	+ <u>0,13</u>	+ 1178	+ <u>583</u>	
	(4)	+ 3,1	<u>0</u>	+ 1266	+ 695	
RI 36-1 glucose	1 (*)	+ 1,0	+ 1,4	+ 381	+ 708	
	1 (*)	+10,5	+ <u>0,6</u>	+ 2351	+ 956	
Genre Corynebacterium						
RI 26-3 glucose	1	+15,7	+ 1,7	+ 217	+ 569	
	2	+38,9	+ 2,5	+ 285	+ 1128	
	1	+19,0	+ 2,6	+ 581	+ <u>599</u>	+ 90
	2	+ <u>32,8</u>	+ 3,9	+ 1476	+ <u>1148</u>	
Pasteur glucose	2	+36,4	+ 5,4	+ 13	+ 560	
	2	+42,8	+ 9,1	+ 287	+ <u>561</u>	

* même ordre des cultures que pour les souches correspondantes des tableaux VI et VII

(*) culture avec souche récemment isolée

(3) (4) cultures dont les valeurs sont représentées dans la figure 1d (souches 237-2 et RI 31-4)

Nous avons souligné d'un trait plein les valeurs qui sont en diminution en présence d'acide pyruvique par rapport aux cultures correspondantes avec glucose et d'un trait pointillé celles qui présentent des variations minimes

VARIATIONS DES TENEURS DU MILIEU EN COBALAMINES - B₁₂ ET EN ACIDES GRAS VOLATILS .

Effet de la substitution du glucose par du pyruvate .

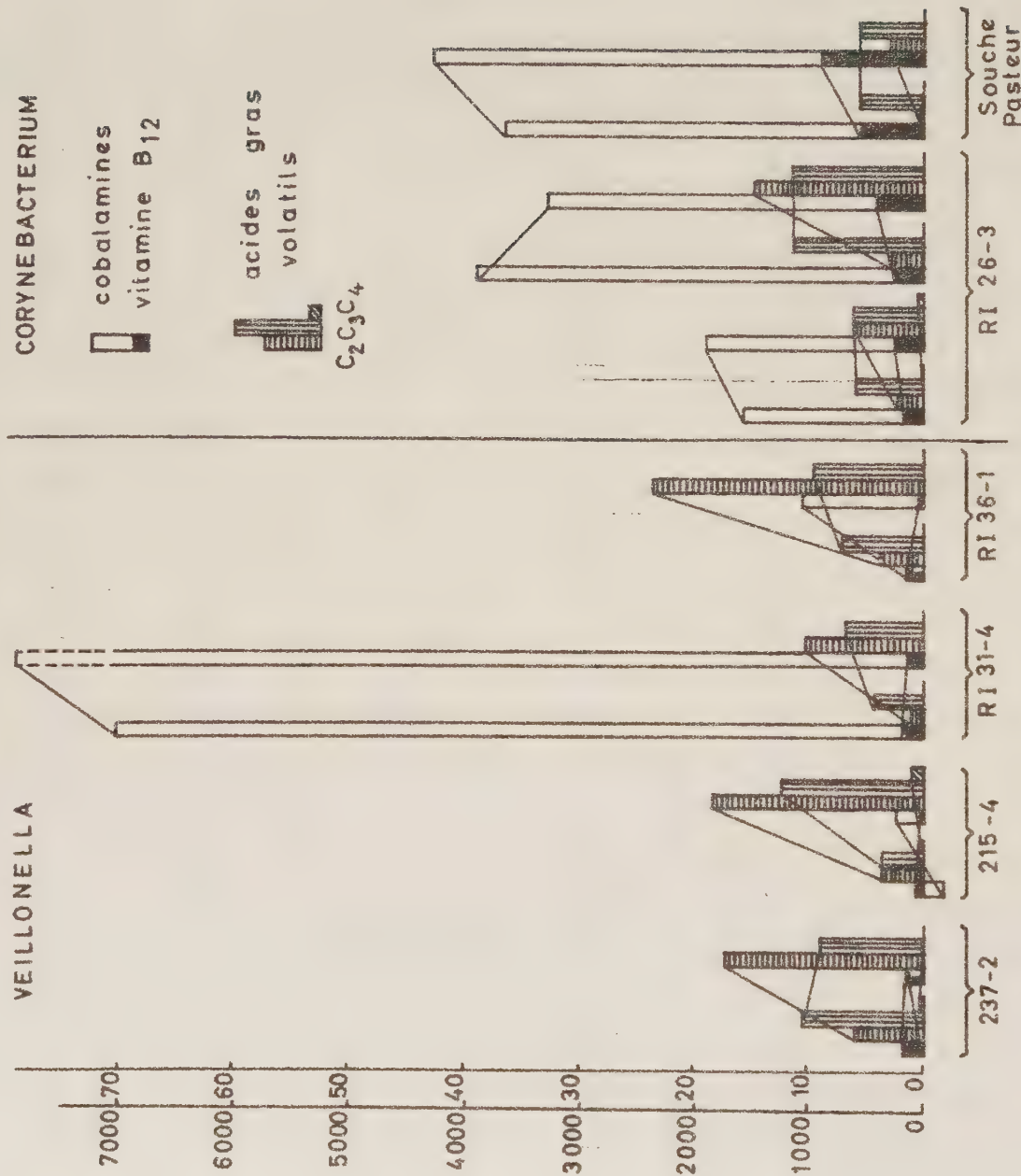


Figure 11

237-2 et RI 31-4 de Veillonella (3 doubles cultures sur 4, FIGURE 12); les deux souches se comportent de la même façon et on note chaque fois une nette augmentation de la croissance microbienne lorsque l'on remplace par du lactate ou par du pyruvate le substrat habituel et cependant les produits du métabolisme sont différents.

- FIGURE 12 -

Croissance de Veillonella et variations du milieu en cobalamines-B12 et en acides gras volatils. Effet de la substitution du glucose par du lactate ou du pyruvate

En présence de lactate, nous avons vu que les productions de vitamine B12 et de cobalamines ainsi que d'acide acétique et d'acide propionique sont beaucoup plus marquées qu'en présence de glucose et nous observons maintenant que la croissance est elle aussi fortement stimulée. On pourrait penser que l'augmentation des productions est due à une population bactérienne plus nombreuse. Ce n'est cependant pas le cas avec l'acide pyruvique: la croissance est beaucoup plus intense qu'avec l'acide lactique mais les productions n'augmentent pas parallèlement. La stimulation de la croissance cellulaire n'apparaît donc pas comme un facteur déterminant des productions accrues. Comme il y a un effet caractéristique de l'acide lactique nous nous croyons en droit de penser qu'il exerce un rôle spécifique sur les biosynthèses de cobalamines-B12 s'accompagnant de fermentation propionique et butyrique et qu'il joue, on quelque sorte, un rôle d'inducteur dans ces réactions enzymatiques.

On sait, par ailleurs, que l'acide pyruvique est métabolisé préférentiellement en acide acétique et donc qu'il infléchit le métabolisme vers des voies différentes de celles qui aboutissent à une fermentation propionique prédominante.

d)- Effet d'un donneur de méthyle : la méthionine .

Dans une étude préliminaire, nous avons étudié la synthèse des cobalamines et de la vitamine B12 chez un Actino-

myces réputé bon producteur : Streptomyces olivaceus . Dans des conditions qui diffèrent sensiblement de celles employées ici (cultures agitées de 200 ml de milieu à base de farine de soja; dosage dans le mycélium, nous avons mis en évidence une augmentation de 60 à 100 p.100 des cobalamines et de la vitamine B12 par adjonction de 1-2 pour 1000 de méthionine dans le milieu (182), puis également l'effet favorable d'autres donneurs de méthyle (bétaine, choline) et celui défavorable des porteurs de groupes sulfhydriles précurseurs de la méthionine (homocystéine, homocystine) (183). Il convenait donc d'étudier l'effet de la méthionine, donneur de méthyle le plus actif sur les synthèses réalisées par des bactéries isolées de l'intestin du rat. L'essai a porté sur la souche RI 31-4 de Veillonella selon nos conditions opératoires habituelles. Par adjonction de 1 p.1000 de méthionine au milieu, la synthèse des cobalamines augmente de 20 p.100 et celle de vitamine B12 de 50 p.100. En présence de 2 p.1000 de méthionine ces augmentations atteignent respectivement 40 à 50 p.100 . (*).

L'influence favorisante de la méthionine se trouve donc confirmée. Son mécanisme d'action pourrait être d'intervenir dans la synthèse proprement dite de la molécule de vitamine B12 (29,166) (on sait que dans la constitution de celle-ci entrent 11 groupes méthyles) ou, plus simplement, d'épargner une partie du besoin en vitamine B12 qui est nécessaire ou, du moins, qui intervient dans la synthèse de la méthionine.

3)- Cultures mixtes de genres microbiens différents

Pour rapprocher les conditions de croissance in vitro des populations microbiennes de leur écologie normale où les interactions entre les souches sont permanentes nous avons fait quelques cultures mixtes, se composant d'une part d'une souche de Veillonella très active (souche 229-26), d'autre part, de souches

(*)- Bien entendu les valeurs tiennent compte du fait que E. Coli réagit à la méthionine : les résultats pour les cobalamines totales ont donc subi les corrections nécessaires.

CROISSANCE DE VEILLONELLA ET VARIATION DU MILIEU EN COBALAMINES
B₁₂ ET EN ACIDES GRAS VOLATILS .

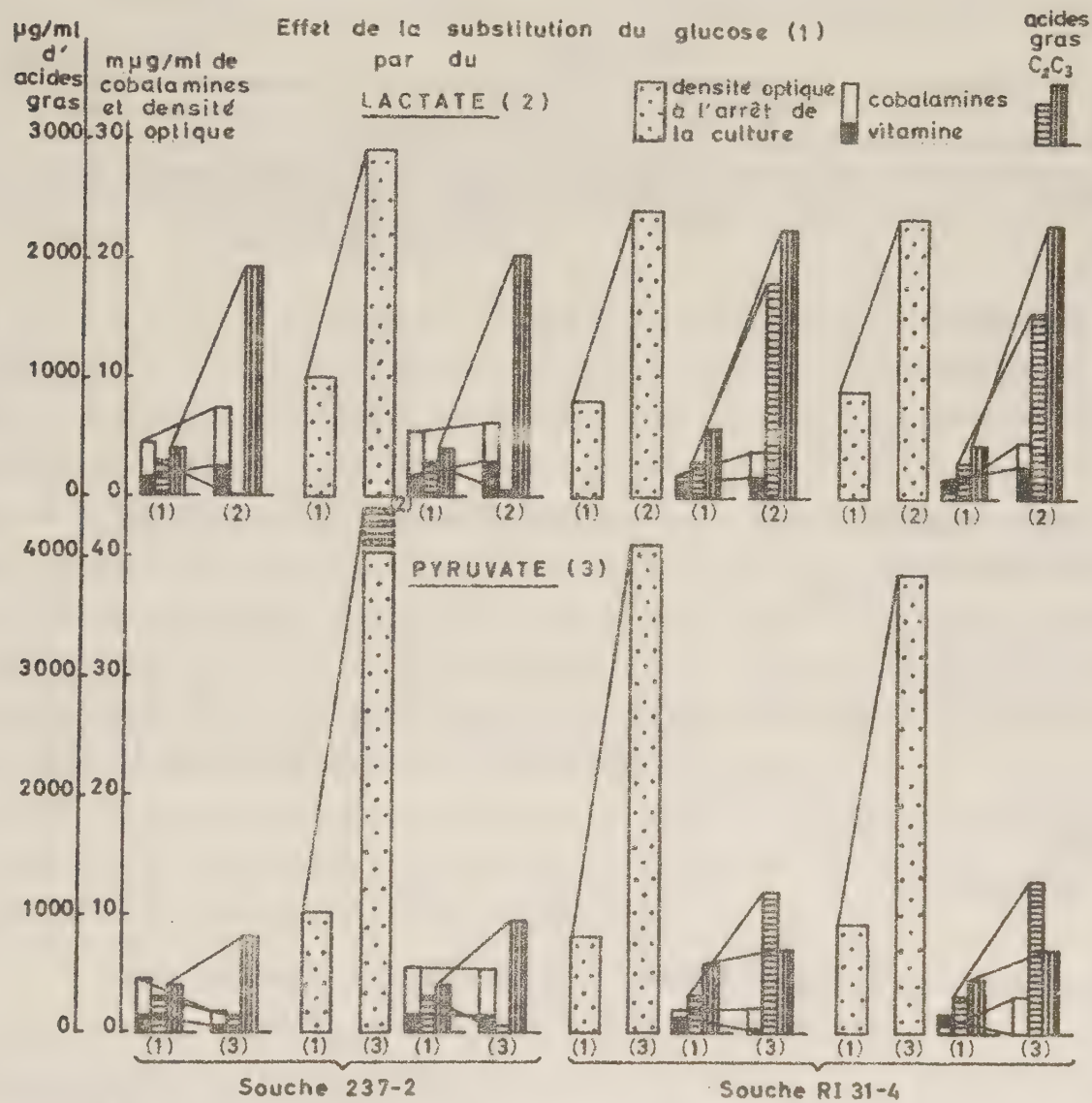


Figure 12

- TABLEAU X -

Variations des cobalamines et vitamine B12 dans les milieux des cultures mixtes
de Veillonella et d'un genre associé

Genres et souches	Cobalamines			Vitamine B12		
	Teneurs en $\mu\text{g}/\text{ml}$	Différences * en $\mu\text{g}/\text{ml}$	en %	Teneurs en $\mu\text{g}/\text{ml}$	Différences * en $\mu\text{g}/\text{ml}$	en %
<u>Culture mixte avec Veillonella (229-26)</u>						
<u>Veillonella</u>	34,8			3,0		
<u>Veillonella</u>						
+ <u>Eubacterium</u>		+ 4,0	+ 11	0	0	
+ <u>Lactobacillus</u> (341)		+ 1,5	+ 4	0	0	
+ <u>Bifidobacterium</u> (235-2)		+ 13,8	+ 40	+ 2,0	+ 67	
+ <u>Levure</u>		+ 7,8	+ 22	+ 1,7	+ 56	
+ <u>Pentostreptococcus</u>		+ 12,4	+ 36	+ 1,3	+ 43	
+ <u>Bifidobacterium</u> (235-24)		+ 10,2	+ 29	+ 1,4	+ 58	
+ <u>Streptococcus</u>		+ 9,6	+ 28	+ 0,9	+ 30	
+ <u>Escherichia</u>		- 4,0	- 11	+ 1,0	+ 30	
<u>Veillonella (RI 31-4) et Lactobacillus (313)</u>						
<u>Veillonella</u>	16,4			1,2		
<u>Veillonella</u>						
+ <u>Lactobacillus</u>		- 7,8	- 48	+ 0,2	+ 17	
<u>Production d'acides gras volatils par la culture mixte</u> <u>Veillonella (RI 31-4) + Lactobacillus (313)</u>						
	Acide acétique en $\mu\text{g}/\text{ml}$		Acide propionique en $\mu\text{g}/\text{ml}$	Acide butyrique en $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<u>Veillonella</u>	330		458	7		
<u>Veillonella</u> + <u>Lactobacillus</u>	117	- 65 %	66 - 86 %	17	+ 140 %	

* Différences calculées par rapport à Veillonella en culture isolée

Les diminutions ou les variations très faibles sont soulignées d'un trait plein

appartenant à des genres producteurs d'acide lactique et dont l'appétitude à la synthèse des cobalamines est très médiocre : Eubacterium, Lactobacillus 341, Streptococcus, Peptostreptococcus, Escherichia et Bifidobacterium 235-2 et 235-24, ainsi qu'une levure isolée elle aussi de la flore intestinale du Rat. Une souche moins active de Veillonella (RI 31-4) a été testée en association avec la souche 313 de Lactobacillus.

- TABLEAU X -

Variations des cobalamines-B12 dans les milieux des cultures mixtes de Veillonella d'un genre associé. Production d'acides gras volatils d'une culture mixte

Le TABLEAU X rapporte les teneurs du milieu en cobalamines-B12 et les pourcentages de variation par rapport à la même culture pure de Veillonella. Les augmentations dues à ces associations sont assez générales mais non constantes. Elles sont le fait de Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Streptococcus et de la levure, aussi bien pour les cobalamines totales que pour la vitamine B12, et de Escherichia pour la vitamine B12 seule. Les augmentations même les plus nettes peuvent paraître de faible amplitude (en moyenne + 31 p.100 pour les cobalamines, + 47 p.100 pour la vitamine B12). Cependant, si on se réfère au TABLEAU I on remarquera que le seul surcroît de production provoqué par la culture associée de Veillonella la équival aux synthèses des genres considérés comme des bons producteurs de cobalamines et de vitamine B12.

Si l'association des cultures accuse une tendance à augmenter les synthèses ce n'est pas une règle générale : dans le cas des comparaisons entre culture pure et culture mixte de Veillonella RI 31-4, la présence de Lactobacillus 313 détermine une diminution très nette des teneurs du milieu en cobalamines et une augmentation faible de la vitamine B12. Nous avons étudié dans ce cas la production d'acides gras volatils et nous observons la diminution des acides acétique et propionique avec une production importante d'acide butyrique (+ 140 p.100) concomitante à celle de la vitamine B12 (+ 17 p.100).

Bien que les essais soient peu nombreux nous pouvons essayer de tirer des conclusions de deux sortes :

- la diminution des cobalamines et acides volatils est surtout nette avec Lactobacillus genre qui a déjà manifesté, au cours de cette étude, les capacités de destruction les plus fortes ou les aptitudes de synthèses les plus faibles pour les métabolites qui nous intéressent. Or, comme nous le verrons, les lactobacilles appartiennent du point de vue écologique à la catégorie dite "flore dominante "; s'ils utilisent les cobalamines ou la vitamine B12 synthétisées par les Veillonelles (tandis que celles-ci profitent de l'acide lactique), nous pensons que l'association Veillonella-Lactobacillus peut être considérée comme complémentaire.

- l'augmentation des métabolites étudiés indique peut-être une synergie d'action entre les cultures associées: l'augmentation obtenue par la présence d'un deuxième genre n'a pas de commune mesure avec les capacités de synthèse minimales de celui-ci en culture isolée. Cela ne peut que renforcer notre conviction que les capacités de synthèse in vivo dépassent de loin les résultats obtenus in vitro : des souches récemment isolées, telle la souche 343-25 de Butyribacterium, présentent un pouvoir de synthèse qui diminue lors des cultures pures successives in vitro, peut-être par manque d'association avec d'autres genres. D'où l'intérêt qu'il y aurait à faire des études d'associations bactériennes contrôlées directement dans le tube digestif.

*

* *

*

B)- SYNTHESE DES COBALAMINES IN VIVO PAR LA MICROFLORE DU RAT ET
EFFET DES REGIMES CARENCES -

1)- Les populations bactériennes du contenu caecal
suivant le régime.

La grande complexité de l'étude de la micro-flore autochtone du Rat a bien été mise en évidence par RAIBAUD et coll. (149). Faute de moyens de dénombrement sûrs pour toutes les espèces bactériennes on ne peut que dresser un tableau partiel des bactéries constituant la flore dite "normale" du Rat. Suivant l'importance numérique des genres qui ont pu être dénombrés ces auteurs répartissent les différentes souches en flore "dominante" (10^{10} - 10^7 bactéries/ g d'échantillon frais) ou "sous-dominante" ($\leq 10^7$). Par rapport à ce critère voici comment peuvent se classer les souches étudiées provenant d'une flore autochtone de rat sevré soumis à un régime complet et équilibré :

- Flore dominante - : Acuformis, Bifidobacterium, Catenabacterium, Clostridium, Corynebacterium anaérobies stricts, Endosporus, Mubacterium, Lactobacillus, Peptostreptococcus, Ranibacterium, Ristella, Streptococcus (caecum), Veillonella (caecum).

- Flore sous-dominante : Actinobacillus, Bacillus, Corynebacterium aérobies, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Micrococcus, Staphylococcus, Levures.

Il pouvait être intéressant de voir quelles étaient les bactéries dominantes chez les rats adultes placés à un régime strictement carencé en vitamine B12. P. RAIBAUD et son équipe ont bien voulu effectuer le travail d'isolement et de dénombrement des souches à partir de caecums de rats maintenus en régime carencé pendant 6 générations.

- TABIEAU XI -

Estimation du nombre des bactéries de divers genres du caecum de rats à flore autochtone (régime carencé en vitamine B12 depuis plusieurs générations).

Le TABLEAU XI nous indique quelle est la répartition en flore dominante ou sous-dominante des bactéries dénombrées. D'autres genres sont peut-être présents qui n'ont pu être mis en évidence ; cependant il est très improbable qu'ils fassent partie de la flore dominante de ces rats. Par ailleurs, contrairement aux résultats trouvés jusqu'ici pour la flore autochtone du Rat, on peut constater que l'ensemble des souches qui, d'après nos résultats in vitro, sont douées d'un bon pouvoir de synthèse pour les cobalamines et la vitamine B12 ne fait pas partie de la flore dominante des animaux carencés, notamment les genres Clostridium, Corynebacterium, Endosporus, Ristella et Veillonella. Les genres Veillonella et Ristella font partie de la flore sous-dominante. Parmi les rats de la 3ème génération nous avons trouvé en "sous-dominante" le genre Butyribacterium qui s'est révélé être le plus fort producteur de cobalamines et de vitamine B12 dans les cultures in vitro. Or, ce genre n'avait pas encore été isolé chez des rats en régime normal. Les productions de Butyribacterium pourraient peut-être suffire aux besoins en vitamine B12 de la microflore et de leur hôte mais on ne retrouve plus ce microorganisme chez les rats de 4ème et de 6ème génération.

Reste le problème des spirilles normalement présentes en nombre inférieur à 10^7 /g mais qui chez les rats carencés sont apparus chaque fois en flore dominante. Malheureusement, ils n'ont pu être cultivés (dénombrement entre lame et lamelle dans une suspension fraîche de caecum). On verra que la production de cobalamines ne diminue pas avec les générations successives de rats maintenus au régime carencé, il faut donc penser que les gros producteurs (éventuellement les spirilles) sont en trop petit nombre ($< 10^5$ /g) pour être aisément mis en évidence avec les méthodes sélectives de RAIBAUD et coll. (148) ou bien que d'autres types microbiens sont en réalité les fournisseurs de vitamine B12 chez ces rats carencés. En faveur d'une action des spirilles nous ne pouvons avancer que le fait suivant : Selenomonas ruminantium est le plus gros producteur de cobalamines que l'on ait trouvé dans le rumen de vache (57). Appar

- TABLEAU XI -

Estimation du nombre des bactéries de divers genres du caecum de rats
à flore autochtone

(régime carencé en vitamine B12 depuis plusieurs générations)

Nombre/g poids frais	3ème génération(4)* $10^9 - 10^{10}$	4ème génération(3)* $10^8 - 10^{10}$	6ème génération(4)* $10^7 - 10^9$
Flore dominante  GENRES	<u>Eubacterium</u> <u>Lactobacillus</u> <u>Peptostreptococcus</u> <u>Ramibacterium</u> Spirilles	<u>Eubacterium</u> <u>Lactobacillus</u> <u>Peptostreptococcus</u> <u>Ramibacterium</u> Spirilles	<u>Lactobacillus</u> <u>Peptostreptococcus</u> <u>Ramibacterium</u> Spirilles
 Flore sous-dominante	<u>Actinobacillus</u> <u>Butyribacterium</u> <u>Escherichia</u> <u>Micrococcus</u> <u>Streptococcus</u> <u>Veillonella</u>	<u>Endosporus</u> <u>Escherichia</u> <u>Micrococcus</u> <u>Streptococcus</u> <u>Veillonella</u>	Levures <u>Escherichia</u> <u>Ristella</u> <u>Streptococcus</u> <u>Veillonella</u>
Nombre/g poids frais	$10^4 - 10^6$	$10^5 - 10^7$	$10^4 - 10^6$

* (4) (3) nombre de caecums ayant servi à l'étude des populations

- TABLEAU XVI -

Moyennes des contenus du caecum de Rat à flore autochtone en cobalamines
et vitamine B12 (en m µg)

Rats et génération	Nombre	Régime	Age en mois	Sexe	Cobalamines	Vitamine B12	Vitamine B12 Cobalamines
Contrôle	4	normal	2	♂	637	272	43 %
-	2	-	3	♂	5432	608	11 %
1ère	6	subcarencé	6	♂	1324	288	22 %
1ère	7	carencé	6	♂	2982	569	19 %
-	<u>5</u>	-	6	♀	<u>3260</u>	<u>470</u>	<u>14 %</u>
3ème	4	-	4	♂	3324	184	6 %
-	<u>5</u> (4) *	-	8	♀	<u>3418</u>	<u>574</u>	<u>17 %</u>
4ème	5 (3) *	-	4	♂	5036	278	6 %
-	<u>3</u>	-	4	♀	<u>5807</u>	<u>417</u>	<u>7 %</u>
6ème	<u>4</u> (4) *	-	9	♀	<u>2940</u>	<u>463</u>	<u>16 %</u>

Le régime subcarencé est à base de caséine dévitaminée; le régime carencé à base de farine de soja
Les valeurs concernant les Rats femelles sont soulignées d'un trait

* (4) (3) = nombre de caecums ayant servi à l'étude des populations

tenant à la famille des Spirillaceae, il n'est pas éloigné du point de vue taxinomique des spirilles.

2)- Cobalamines et vitamine B12 du contenu caecal suivant le régime.

Nous rapportons ici quelques résultats des analyses consacrées aux réserves et contenus en cobalamines-B12 des rats en expérience, sans préjuger de l'exposé plus complet qui figure dans la suite de ce travail. L'analyse des caecums a été faite chez des rats assez âgés (4-9 mois), conjointement, s'il y avait lieu, avec les études d'isolement et de dénombrement des populations.

- TABLEAU XII -

Moyennes des contenus du caecum de Rat à flore autochtone en cobalamines et vitamine B12 (en µg)

Le TABLEAU XII indique les quantités de cobalamines et vitamine B12 par caecum total suivant le régime, la génération, l'âge et le sexe des rats (nous avons souligné d'un trait les valeurs pour les femelles pour faciliter la lecture du tableau). N'ayant pas prévu des rats témoins recevant de la vitamine B12 à ce stade de notre expérimentation, nous avons ajouté quelques valeurs obtenues sur des animaux plus jeunes placés en régime équilibré. Il va de soi que ces valeurs ne représentent qu'un sondage de contrôle et ne sont données qu'à titre indicatif. On remarque tout d'abord que, compte-tenu d'une marge de variations assez large, l'ordre de grandeur demeure assez constant tant pour les cobalamines que pour la vitamine B12. Seuls les rats au régime normal âgés de 2 mois présentent un contenu en cobalamines assez bas. Mais il faut considérer que ces rats et leur caecum n'ont pas atteint la taille adulte; ceci permet d'estimer le contenu correspondant en vitamine B12 comme relativement élevé, ce que souligne le taux de vitamine B12 par rapport aux cobalamines totales qui est de 43 p.100. Ce pourcentage diffère sensiblement des autres valeurs variant entre 6 et 22 p.100.

Les rats âgés de 2 mois mis à part, on ne peut relier systématiquement les variations des cobalamines totales et de la vitamine B12 ni à l'âge, ni au sexe, ni au régime alimentaire ni surtout au nombre de générations de rats subissant la carence(*). Les quantités du contenu caecal en cobalamines sont considérables, ce qui n'est nullement en rapport avec la limitation chez les animaux carencés des genres gros producteurs reconnus lors du dénombrement des populations.

Les contenus en vitamine B12 ne tendent pas non plus à s'amenuiser avec la succession des générations en carence. En prenant une valeur moyenne de 400 μg , et nous en tenant aux limites fixées pour les besoins quotidiens du Rat estimés à 25-100 μg par jour(70), le contenu d'un seul caecum représente de 4 à 16 fois ce besoin. On conçoit qu'il suffise à une faible partie de cette vitamine de passer dans l'économie de l'animal pour que soit résolu le problème du ravitaillement en vitamine B12. De plus, il n'est pas prouvé que l'organisme soit totalement incapable de transformer en vitamine active les cobalamines analogues présentes en abondance dans le milieu intestinal.

III - DISCUSSION SUR LES BIOSYNTHESES DES COBALAMINES ET LEUR RÔLE =====

Nous allons considérer successivement :

- 1)- in vitro :-les biosynthèses importantes,
 - les biosynthèses modérées,
 - les biosynthèses non décelables ou nulles
 - les variations des aptitudes synthétisantes,
 - les biosynthèses des associations bactériennes.

(*)- Toutefois nous avons trouvé des cas individuels de plus grande richesse en cobalamines-B12 (jusqu'à 20.000 μg /caecum) chez des rattes en période de gestation ou d'allaitement. Ce fait sera discuté au cours de la 2ème partie de ce travail.

- 2)- in vivo : - la vie en symbiose de la microflore digestive,
- l'incidence d'un régime carencé en vitamine B12 sur la microflore
- l'utilisation des cobalamines synthétisées dans le tube digestif.

1)- Etudes in vitro -

- Biosynthèses importantes . Parmi les souches isolées du tube digestif du rat nous avons mis en évidence que les gros producteurs de cobalamines et de vitamine B12 ont une activité fermentaire à prédominance soit propionique (Veillonella, Corynebacterium) soit butyrique (Butyribacterium, Clostridium, Ristella, Welchia, Sphaerophorus). Si l'on connaît bien le rôle que joue le coenzyme B12 de la méthylmalonylisomérase dans les processus métaboliques aboutissant à la formation de l'acide propionique, on ne sait rien d'un mécanisme d'action éventuel de la vitamine B12 dans la fermentation butyrique. Cependant, chez ces bactéries, les réactions enzymatiques qui dépendent de la biosynthèse des cobalamines doivent être importantes et fréquentes puisqu'elles concernent son métabolisme énergétique essentiel (accumulation des produits de fermentation). Les synthèses de cobalamines et de vitamine B12 doivent être activées par ces réactions énergétiques et fermentaires. L'intensité que peuvent atteindre ces synthèses ressort du fait que la production industrielle de vitamine B12 à l'état pur est actuellement assurée en majorité par des microorganismes du genre Propionibacterium. Les biosynthèses très importantes doivent à notre avis répondre aux besoins d'une fermentation très orientée.

- Biosynthèses modérées . Nous distinguerons la synthèse de la vitamine B12 et celle de ses analogues.

La culture en tube de 84 souches, appartenant à 18 genres d'anaérobies stricts ou facultatifs a montré que toutes les souches sans exception sont capables de synthétiser des quantités modérées de vitamine B12 proprement dite, sans doute à partir

des cobalamines analogues se trouvant dans le milieu. L'étude des fermentations montre des productions le plus souvent limitées à l'acide acétique. Les fermentations propionique et butyrique sont occasionnelles. Nous pensons que la vitamine B12 synthétisée en petites quantités sert aux besoins de la division cellulaire, besoins qui sont minimes si on se rapporte aux doses efficaces comme facteurs de croissance pour les microorganismes servant à nos dosages. Ainsi une bonne croissance des populations de Escherichia coli 113-3 est réalisée dans nos dosages avec des quantités de 2 à 16 μg (microgrammes = 10^{-12} g) de vitamine B12 par ml.

La culture aérobie (erlenmeyer) des anaérobies facultatifs a montré que les fermentations acétiques sont beaucoup plus importantes qu'en absence d'oxygène et dans deux cas seulement (Staphylococcus et Micrococcus) elle provoque une production d'acide propionique. Or, la culture en aérobiose stimule également la synthèse (ou provoque une épargne) des cobalamines du milieu autres que la vitamine B12. On peut donc se demander si cette fermentation acétique ne ferait pas appel à un stade donné de son processus à l'intervention d'un des analogues de la cyanocobalamine en tant que coenzyme. Ces analogues se trouvent souvent en quantités importantes dans les productions microbiennes des anaérobies facultatifs mais, faute de correspondre à un besoin de l'homme, on n'a jamais essayé, jusqu'à présent, d'élucider le rôle qu'ils jouent.

- Biosynthèses non décelables ou nulles . Parmi les genres qui tendraient à consommer à la fois des cobalamines totales et de la vitamine B12 il faut citer Lactobacillus. La remarque faite à propos des synthèses modérées est valable ici : il doit s'agir de consommation pour des besoins limités à la croissance des populations (division cellulaire). On peut concevoir que les bactéries non synthétisantes ont subi une perte de fonction très générale si le milieu ambiant est toujours pourvu des quantités de cobalamines nécessaires à leurs besoins.

- Variations des aptitudes synthétisantes . Une longue durée de conservation d'une souche peut déterminer des pertes de fonctions plus ou moins réversibles : dans nombre de cas chez Butyribacterium et Veillonella nous avons constaté avec le temps un amenuisement progressif des capacités de synthèse des cobalamines. Une souche au départ bonne productrice peut donc présenter des synthèses médiocres ou pas de synthèses au bout d'un certain temps de conservation. Le meilleur critère pour établir une première classification a donc été de tester les souches dans les conditions où elles risquent de conserver leurs plus grandes potentialités, c'est-à-dire après un isolement récent. Les procédés classiques à base de repiquages répétées pour rendre les souches plus actives se sont révélés aléatoires.

Enfin, des souches ne présentant pas d'aptitudes synthétisantes dans nos conditions de culture standard peuvent les révéler dans des conditions différentes. Il s'agit peut-être là de la manifestation d'une fonction latente. Nous ne mentionnerons qu'à titre d'exemple que quelques résultats d'essais actuellement en cours. Sur milieu standard (glucose) et dans nos conditions de culture, Lactobacillus ne synthétise pratiquement pas de cobalamines et de vitamine B12. Il en élabore, par contre, de notables quantités si on prolonge le temps d'incubation (4 jours) ou si on remplace le glucose du milieu par du lactate.

- Biosynthèses des associations bactériennes - Pour ce qui a trait au problème des biosynthèses ainsi qu'au rôle des cobalamines et de la vitamine B12, on peut concevoir les associations bactériennes sous deux aspects.

Sur le plan quantitatif on assiste parfois à une synergie majorant de façon sensible les synthèses observées en culture pure. Autrement dit, si on additionne les résultats des cultures pures de chaque souche séparée, cette somme est de loin inférieure aux valeurs obtenues par les cultures mixtes ; c'est le cas de

l'association de Veillonella avec Bifidobacterium ou Streptococcus. Il peut y avoir au contraire antagonisme comme pour les cultures de Veillonella avec Lactobacillus ou Escherichia, l'effet dépressif pouvant s'étendre des cobalamines à la production d'acides gras volatils, ainsi que nous en avons donné un exemple (TABLEAU X).

Indépendamment des synthèses de cobalamines, on peut considérer l'influence réciproque des deux espèces bactériennes par rapport à leurs besoins de croissance. Il peut y avoir alors soit complémentarité comme théoriquement entre Veillonella et Lactobacillus, le premier fournissant des cobalamines au second tout en utilisant sa production d'acide lactique; soit concurrence qui se traduirait pour les deux organismes par une diminution des réponses de croissance des populations. Ces études sont à leur début, mais les relations envisagées peuvent servir d'ores et déjà à comprendre ou à tenter d'analyser ce qui se passe avec une flore plus complexe et notamment in vivo .

2)- Etudes in vivo -

- La vie en symbiose de la microflore intestinale.

Les problèmes qui se posent à propos des associations bactériennes in vitro se retrouvent ici très élargis en raison de la multiplicité des genres et espèces composant la microflore intestinale du Rat et du fait des relations avec l'animal-hôte. Ces relations elles-mêmes peuvent varier suivant les conditions de vie , de l'animal, son âge et surtout son régime alimentaire. Bien entendu les notions de complémentarité et de concurrence s'étendent aux rapports entre la microflore dans son ensemble et l'hôte qui l'héberge. Du point de vue de la physiologie microbienne et notamment des biosynthèses de cobalamines, l'animal axénique permettra-t-il de reconstituer des associations bactériennes données dans leur milieu "naturel", par des implantations contrôlées des divers souches à étudier ? C'est une étude que nous avons amorcée dans la 2ème partie de ce travail par l'implantation d'une souche de Veillonella au rat axénique.

- Le régime carencé en vitamine B12 et son incidence sur la microflore. La ration alimentaire du rat d'élevage est généralement assez riche en vitamine B12 soit qu'interviennent dans sa composition des protéines d'origine animale, soit que les protéines végétales soient complétées par des sources de vitamine B12 très excédentaires par rapport aux besoins. Pour notre part nous avons réalisé un régime à base de farine de soja strictement carencé en cyanocobalamine. Dans quelle mesure influence-t-il la composition et le métabolisme de la microflore ? Celle-ci se transmet par contamination naturelle d'une génération à l'autre. Dans des conditions données d'élevage elle garde peut-être une certaine permanence dans sa composition, du moins entre certaines limites. Mais cela nous ne pouvons l'affirmer et nous n'avons pas le droit de conclure en attribuant à la seule absence de vitamine B12 dans le régime les différences observées au cours des générations de rats carencés. D'autant plus que nous sommes amenés à constater un résultat paradoxal; en carence B12 les changements de composition de la flore du caecum de la 3ème à la 6ème génération se font curieusement dans le sens d'un amenuisement du nombre de bactéries bonnes productrices de cobalamines et de vitamine B12 (Veillonella, Butyribacterium), voire même de leur disparition (Corynebacterium).

Par contre, de l'ensemble des dosages effectués sur les contenus caecaux nous tirons une notion de relative constance dans la production de cobalamines-B12, production qui pourrait suffire amplement à couvrir les besoins de l'hôte, même si elle ne passait que partiellement dans son économie. Force est donc de postuler l'intervention de bactéries autres que celles qui ont pu être isolées et cultivées in vitro et qui se trouveraient dans le contenu intestinal en trop petit nombre ou bien qui, telles les spirilles, n'ont pu encore être éprouvées dans leurs capacités de synthèse. A moins d'admettre que les aptitudes de synthèse soient plus considérables in vivo pour nombre de bactéries que nous avons trouvé peu ou pas productrices et que ces aptitudes soient supprimées (et non seulement diminuées) lors des cultures in vitro.

- L'utilisation des cobalamines synthétisées. Il est probable que les bactéries non productrices consomment une partie des cobalamines libres du contenu intestinal; mais leurs besoins en ce facteur de croissance sont minimes. Si nous en croyons le seuil de sensibilité des microorganismes servant aux dosages (inférieur au dixième de microgramme), l'activité métabolique relative à la division cellulaire semble comporter des besoins limités en vitamine B₁₂. Par contre, chez les bactéries qui présentent une activité fermentaire intense dans laquelle intervient cette vitamine, les besoins seraient plus grands; mais, ces bactéries produisent elles-mêmes, et le plus souvent avec un grand excès, les cobalamines, métabolites essentiels dont elles ont besoin.

Pour tenter d'établir le bilan des cobalamines produites et utilisées dans la lumière intestinale on doit, en une première approche, tenir compte des diverses aptitudes de la microflore in vitro.

Tout d'abord nous pouvons supposer que les trois types de bactéries classées par rapport à leur capacité de synthèse des cobalamines (importante, modérée ou nulle) gardent l'essentiel de leurs caractéristiques lorsqu'elles vivent en symbiose chez l'hôte qui les-abrite. Dans ce cas on obtiendrait un bilan très positif qui ne serait pas contrebalancé par les effets beaucoup moins importants, des autres classes de bactéries. En tout cas nous n'avons pas trouvé de bactéries à ce point prédatrices qu'elles aient fait disparaître la totalité des cobalamines se trouvant dans le milieu de culture.

Il est vraisemblable que ce tableau doit changer si l'on tient compte de l'apport en vitamine B₁₂ de la ration, qui peut être très variable. Si cet apport est important il se pourrait que nombre de bactéries qui produisent les cobalamines mettent leur fonction en sommeil. On pourrait même concevoir une régression, voire une perte de leur fonction de synthèse, sans que cela modifie le sens nettement positif du bilan. Si, par contre, l'apport extérieur est nul nous avons pu voir combien les contenus intestinaux en vitamine B₁₂ des rats carencés restent élevés et cela durant plusieurs générations. En définitive le bilan des cobalamines dans la lumière intesti-

nale demeure largement positif.

Une autre question se pose : ces métabolites sont-ils disponibles et utilisables par l'hôte ? De façon évidente si l'animal se livre à la coprophagie; or, c'est là une pratique naturelle chez le Rat. De façon probable en son absence si nous en croyons les récents travaux sur l'absorption de la vitamine B12 à travers la paroi du caecum et du colon(124, 142).

Enfin, comment se traduit chez l'hôte cette richesse en cobalamines des contenus intestinaux lorsque la ration alimentaire en est dépourvue ? C'est une des questions auxquelles nous nous sommes efforcés de répondre dans la suite de ce travail.

IV - CONCLUSIONS (1ère partie)-

=====

1)- Nous avons trouvé de nouveaux genres bactériens, isolés de la flore intestinale du Rat, possédant un important pouvoir de synthèse de cobalamines et de vitamine B12 : Veillonella, Ristella, Welchia, Bacillus, Endosporus, Staphylococcus.

2)- L'ensemble des bons producteurs de cobalamines et de vitamine B12 peut être classé en deux groupes : ceux qui ont un type de fermentation à prédominance propionique (Veillonella, Corynebacterium, Sphaerophorus) et ceux ayant un type de fermentation à prédominance butyrique (Butyribacterium, Clostridium, Ristella, Welchia) Il s'agit pour la plupart d'anaérobies stricts. Parfois certaines fermentations importantes de 2 ou 3 acides volatils coexistent (Bacillus, Corynebacterium) ou se succèdent dans le temps (Butyribacterium).

3)- Toutes les autres souches isolées de l'intestin du Rat sont capables en culture anaérobie d'effectuer des petites synthèses de vitamine B12 proprement dite.

4)- La culture des anaérobies facultatifs en présence d'air donne des synthèses d'analogues cobalamines, autres que la vitamine B12, qui n'atteignent pas cependant les valeurs de celles des anaérobies stricts précités.

5)- L'acide lactique utilisé comme substrat énergétique pour Veillonella, Corynebacterium et Butyribacterium accroît nettement la synthèse des cobalamines-B12 ainsi que la production d'acides gras volatils dans les types de fermentation à prédominance propionique ou butyrique.

6)- Une fermentation acétique importante accompagne en général des synthèses modérées de cobalamines autres que la vitamine B12 (anaérobies facultatifs en aérobiose). L'acide pyruvique utilisé comme substrat énergétique de Veillonella (anaérobie strict) provoque des résultats analogues.

7)- L'adjonction de 2 p.1000 de méthionine à une souche de Veillonella détermine des augmentations de 40 à 50 p.100 des teneurs en cobalamines et en vitamine B12 du milieu.

8)- Les cultures mixtes in vitro permettent de mettre en évidence soit des effets d'utilisation des synthèses de cobalamines (Veillonella et Lactobacillus), soit des actions de synergie dépassant sensiblement la simple addition des pouvoirs de synthèse des cultures pures.

9)- Les contenus caecaux des rats au régime totalement carencé depuis plusieurs générations témoignent de synthèses très intenses. Il n'est pas sûr que les genres de bactéries responsables de la plupart de ces synthèses soient les mêmes que ceux qui se sont révélés in vitro bons producteurs de cobalamines et de vitamine B12.

- S E C O N D E P A R T I E -
=====

- ETUDE COMPAREE DE LA CARENCE B12 CHEZ LE RAT NORMAL ET

LE RAT AXENIQUE -

L'importance des synthèses intestinales de cobalamines est si grande que leur intervention dans l'économie de l'animal-hôte ne peut guère être mise en doute. Encore fallait-il pour mieux connaître ce phénomène déterminer les variations des réserves de vitamine B12 lorsque l'animal reçoit une ration alimentaire qui en est carencée partiellement ou totalement.

Pour ce faire nous avons examiné l'état des réserves chez des rats axéniques et chez des rats normaux, à flore microbienne autochtone, soumis à divers régimes à base de caséine dévitaminée ou de farine de soja, supplémentés ou non en vitamine B12. En poursuivant cette étude au cours de plusieurs générations successives, nous nous sommes efforcés d'étudier ces deux groupes d'animaux dans des conditions autant que possible similaires : race, nombre d'individus, régime, état physiologique. Mais s'il était possible de faire des comparaisons directes pour ce qui est des rats de première génération et de leurs portées, il n'en était pas de même avec les générations subséquentes. Nous ne pouvions, dès lors, garder un strict parallélisme dans le protocole expérimental. Nous avons donc choisi de traiter des effets du régime carencé successivement :

- chez les rats axéniques ou non de première génération,
- chez les rats normaux des générations suivantes,
- chez les rats axéniques des générations suivantes, supplémentés en vitamine B12.

En effet, pour suivre les effets de la carence au long des générations successives de rats axéniques il a fallu introduire dans le régime une dose limite de cyanocobalamine, suffisante pour empêcher l'effet léthal à brève échéance mais trop faible pour que les

réserve soient reconstituées. Nous avons pu décrire ainsi les signes cliniques de l'avitaminose B12 chez le Rat et, par voie de comparaison avec ce qui a été observé dans d'autres espèces, poser le problème du besoin et du rôle de la cyanocobalamine chez l'animal supérieur.

Il ne nous paraît pas inutile, avant de terminer notre avant-propos, de faire quelques remarques sur la terminologie utilisée dans cette étude. Nous employons souvent le terme de rat à flore autochtone pour indiquer qu'il s'agit du rat normal (ou conventionnel au sens des auteurs anglo-saxons), porteur de sa microflore d'origine non modifiée par nous. Le rat axénique (sans germes "ou germ-free"), terme déjà consacré par l'usage, désigne le rat exempt de tout organisme microbien (mais non viral, en quoi le terme prête à discussion). Nous n'ignorons pas que le vocabulaire s'est enrichi de mots nouveaux créés par les spécialistes de ce genre d'études forcés de désigner de façon concise le matériel sur lequel ils travaillent. Nombre de ces néologismes auront sans doute droit de cité dans un proche avenir. C'est pourquoi nous avons peut-être pêché par timidité en ne les employant pas, mais nous avons voulu faciliter avant tout le travail du lecteur en usant de termes plus communs .

Voici un rappel incomplet de ces nouveaux termes :

- | | |
|-----------------------|--|
| - <u>holoxénique</u> | = normal à microflore autochtone ou d'origine, |
| - <u>axénique</u> | = sans aucun microbe, |
| - <u>monoxénique</u> | = monoflore, uniflore, porteur d'une seule souche ou espèce, |
| - <u>dixénique</u> | = biflore, diflore, |
| - <u>polyxénique</u> | = porteur de nombreuses espèces, |
| - <u>gnotoxénique</u> | = porteur d'une flore connue ou contrôlée. |

Il est certain que toute la richesse des possibilités d'étude d'un matériel comme les animaux sans germes microbiens se révé-

lera après les études préalables d'implantation de souches isolées ou associées. Lorsqu'on pourra travailler sur un animal à flore contrôlée nous aurons un moyen très efficace d'élucider les problèmes de biosynthèse des cobalamines par des souches vivant dans des conditions "naturelles " sinon tout à fait dans leur vrai milieu habituel. Dans cette optique nous avons effectué une implantation de Veillonelles dans le tube digestif de rats axéniques, réalisant ainsi une monoflore à base d'une souche bonne productrice de cobalamines, et nous avons commencé à en étudier les effets en régime carencé. Cela n'est que l'amorce d'un travail éventuel qui permettra peut-être de rétablir un animal axénique carencé grâce à la simple implantation d'une microflore favorable. Mais il n'était pas possible d'avancer dans cette voie avant d'avoir obtenu une véritable carence B12 chez le Rat axénique.

I - METHODES - =====

1)- ANIMAUX D'EXPERIENCE -

Nous avons utilisé des rats Wistar , importés en 1956 d'un élevage de Carworth Farm (U.S.A.) et désignées par l'appellation W-CF. Ces rats sont élevés à la fois dans des conditions classiques (rats normaux ou à microflore autochtone) et dans des conditions stériles (rats axéniques).

Les rats axéniques sont protégés de la contamination microbienne dans des isolateurs stériles. Deux types d'isolateurs servent à cet usage ; les uns, isolateurs de REYNIERS (154), sont en acier inoxydable et stérilisés par la vapeur à 120°C avant d'être mis en service ; les autres, appareil de TREXLER (179), sont transparents, faits de polyvinyle et stérilisés par un aérosol d'acide péricétique. L'air est stérilisé par des filtres en laine de verre. L'eau, la nourriture et le matériel de litière sont stérilisés par autoclavage et sont introduits dans les appareils par des sas qu'on peut rendre stériles au moment du service. Les manipula-

tions se font à l'aide de gants fixes dont sont pourvus les deux types d'isolateurs, l'appareil de REYNIERS comportant en outre des hublots.

Les rats W - CF axéniques ont été obtenus par le Dr. E. SACQUET (qui dirige le service des animaux sans germes du C.N.R.S.), en prélevant les fœtus au moment le plus proche de la mise-bas naturelle par césarienne aseptique et leur allaitement a été assuré par des rattes axéniques reçues du LOBUND (Laboratoire de bactériologie de l'Université Notre Dame, INDIANA, U.S.A.). Ces rats W-CF se reproduisent normalement dans des conditions amicrobiennes depuis 1963 et leur état axénique est contrôlé selon les méthodes préconisées par WAGNER (189).

2)- REGIMES ALIMENTAIRES -

Les régimes utilisés diffèrent surtout par la source protéique et l'apport en vitamine B12. Ils sont à base soit de caséine dévitaminée (subcarencé) soit de farine de soja (carencé).

On trouvera ci-dessous la composition en grammes des deux régimes employés :

	<u>régime subcarencé</u>	<u>régime carencé</u>
Caséine dévitaminée	220	--
Farine de soja	-	400
Farine de riz	500	350
Huile de maïs et vitamines liposolubles(*)	66	45
Cellulose	50	50
Mélange salin(**)	48	48
Mélange vitaminique(***)	7,7	7,7
Eau	200	200
<u>TOTAL</u>	<u>1091,7</u>	<u>1100,7</u>

(*)- Vitamine A 10.000 U.I., Vitamine D 1.000 U.I., Vitamine B 1,5 g, Vitamine K3 100 mg, Huile de maïs q.s.p. 66 g.

(**)- En grammes : CO3Ca 15, PO4H2K 2,75, PO4HK2 11,25, PO4HNa2 10, IK 0,0375, ClNa 2,5, SO4Mg 1,75, SO4Mn 0,625, Citrate de fer 3,75, SO4Cu 0,192, Cl2Co 0,025, SO4Zn 0,05, Borate de sodium 0,025, Alun 0,0375.

(***)- En milligrammes : Thiamine 60, Riboflavine 30, Nicotinamide 50, Acide nicotinique 50, Pantothénate de calcium 300, Chlorhydrate de choline 2000, Pyridoxine 20, Pyridoxamine 4, Biotine 1, Acide folique 10, Acide paraaminobenzoïque 50, Amidon de maïs 2170, Mésoinositol 1000, Vitamine C 2000.

La caséine dévitaminée utilisée était d'origine industrielle, préparée par un traitement classique. Malgré les procédés de purification répétés 3 fois, cette caséine n'était pas complètement exempte de cyanocobalamine car les dosages indiquaient une teneur moyenne de 2 $\mu\text{g/g}$ de caséine (*), soit une quantité de 0,4 $\mu\text{g/g}$ de régime. Dans nos essais les quantités de régime ingérées par le rat en croissance se situent entre 20 et 30 g/jour, ce qui correspond à une ingestion de 8-12 μg de vitamine B12/rat/jour. En retenant le chiffre de 25 à 100 μg de vitamine B12 (70,113), comme besoin quotidien du Rat, celui-ci est loin d'être couvert par le régime à base de caséine dévitaminée qui mérite l'appellation de "subcarencé".

Nous avons employé deux types de farines délipidées de soja. La première farine, dite "Soyadyn", nous a donné des difficultés : lors de la stérilisation, l'aliment formait un magma compact, résistant à la pénétration de la vapeur. L'autoclavage, dans ces conditions, pouvait laisser subsister des spores; plusieurs cas de contamination se sont produits dans les isolateurs. Par la suite nous avons adopté la farine dite "Soyoptim" de même composition chimique, mais traitée différemment du point de vue granulométrique; elle nous a donné un aliment facile à stériliser. Nous avons à plusieurs reprises vérifié que l'apport en vitamine B12 de ce régime était nul. Nous avons introduit dans les régimes la caséine dévitaminée et la farine de soja en proportions isoazotées. Etant donné que la farine de soja représente aussi un certain apport glucidique et même lipidique, nous avons modifié en conséquence les quantités de farine de riz et d'huile de maïs de façon que le régime carencé ait le même équilibre en constituants principaux que le subcarencé. Ces régimes, si on leur ajoute des quantités de vitamine B12 au taux des régimes normaux (en excès par rapport aux besoins), sont

(*)- Nous avons trouvé les mêmes teneurs dans une caséine dévitaminée d'origine américaine.

capables d'assurer une croissance et reproduction normales ainsi que nous avons pu le constater chez nos rats axéniques témoins.

Enfin, dans certaines expériences faites avec chacun des régimes nous avons été amenés à fournir aux animaux axéniques un supplément minime de vitamine B12 : nous avons ajouté, lors de la préparation de l'aliment avant autoclavage, une quantité connue d'une solution pure de cette vitamine puis nous avons fait, après stérilisation, des dosages de contrôle de l'aliment pour connaître exactement l'apport en vitamine B12 réalisé.

3)- MESURES ET PRELEVEMENTS EN COURS D'EXPERIENCE -

Contrôle de la croissance pondérale. Les rats de l'élevage normal comme ceux de l'élevage axénique ont été pesés une fois par semaine en vue d'étudier leur gain de poids et l'évolution de leur croissance. Pour pouvoir effectuer la pesée de l'animal axénique une balance de Roberval est introduite stérilement et laissée à demeure dans l'isolateur.

Lorsque nous avons eu des rats d'aspect et de poids déficients nous avons procédé régulièrement à la pesée de la nourriture introduite et de la nourriture non consommée, lors de chaque distribution, pendant toute la période où ces caractères se sont manifestés.

Contrôle de l'état amicrobien . La stérilité bactérienne des rats est contrôlée régulièrement. Les prélèvements sont constitués par l'eau des abreuvoirs et par des matières fécales fraîchement émises. Ces échantillons sont soumis à des examens bactériologiques à l'état frais et après coloration au Gram; ils sont ensemencés en une série de milieux capables de révéler la plupart des bactéries, anaérobies ou aérobies, et des champignons inférieurs : bouillon et gélose nutritive ordinaire, milieu au thioglycolate, milieu de RAIBAUD (148) avec ou sans addition de sang de cheval.

Prélèvements des fèces pour les dosages des cobalamines . Dans nos premières expériences nous avons étudié l'élimination fécale des cobalamines pendant une longue période. A cet effet les rats ont été placés sur grille et deux fois par semaine l'ensemble des fèces de chaque cage a été recueilli dans des boîtes de Pétri en matière plastique puis conservé au congélateur en vue de l'extraction et du dosage.

4)- EXAMENS ET PRELEVEMENTS EN FIN D'EXPERIENCE -

Les rats ont été anesthésiés à l'éther et sacrifiés par ponction du sang à la seringue soit au niveau de l'aorte abdominale soit au niveau du coeur. Au début de notre travail nous prélevions du sang "périphérique " à la queue en vue d'une numération globulaire, puis la ponction aortique nous donnait le sang nécessaire (environ 4ml) pour pouvoir faire le dosage des cobalamines et de la vitamine B12 du sérum(nous n'avons pas poursuivi cette dernière détermination qui ne nous avait pas fourni des résultats significatifs). Cependant, lorsque nous avons été en présence de rats maigres et déficients cette technique de prélèvement s'est révélée impraticable ; nous ne pouvions obtenir la quantité de sang nécessaire ni à la queue ni à l'aorte abdominale par suite d'un collapsus apparent des vaisseaux, peut-être dû à une diminution notable de la masse sanguine. C'est pourquoi nous avons depuis fait un seul prélèvement au niveau du ventricule gauche, ce sang "central" servant à la préparation d'un ou plusieurs frottis, à la numération globulaire et à une détermination de l'hématocrite. Nous avons procédé à ces divers examens de façon à savoir si les animaux en régime carencé présentaient des anémies, des variations du volume globulaire ou des anomalies morphologiques des cellules sanguines.

Frottis sanguins . Une goutte de sang est étalée sur une lame à l'aide d'une lamelle à bords rodés. La préparation sèche est recouverte par le colorant de May-Grünwald durant 3 minutes, diluée avec le même nombre de gouttes d'eau distillée et laissée en contact

durant le même temps, puis plongée dans une solution diluée de Giemsa. Après 20 minutes d'action du dernier colorant les lames sont lavées à l'eau distillée et séchées.

Numération globulaire . Nous utilisons une pipette-mélangeur de Thoma pour faire une dilution du sang au 1/200ème avec du liquide de Hayem. Le mélange bien agité est à nouveau dilué deux fois avec le même liquide pour tenir compte des concentrations en hématies du Rat normalement bien plus élevées que chez l'Homme. C'est donc du sang dilué au 1/400ème que nous déposons dans la cellule d'un hématicimètre de Malassez à deux rigoles limitant le plateau central. Nous dénombrons les hématies se trouvant sur de grands carrés de 0,05mm² lesquels forment avec la lamelle qui recouvre le plateau central un volume de 0,01 mm³. Le comptage de 4 de ces carrés multiplié par 10.000 (soit x 25 x 400), donne le nombre d'hématies par mm³ de sang. En cas d'erreur suspectée ou de résultats inhabituels, nous procédons à une nouvelle dilution à partir du sang conservé avec le liquide de Hayem et à un nouveau comptage.

Hématocrite . Nous utilisons la technique du microhématocrite avec des tubes de verre capillaire héparinés de 75 mm. Le sang est prélevé par aspiration à l'aide d'un cathéter en polyéthylène ajusté au tube hépariné; le bout rodé de celui-ci est enfoncé dans un mastic approprié qui forme bouchon à l'intérieur du tube et permet d'apprécier au moment de la lecture la limite de la colonne sanguine. La centrifugation se fait dans une centrifugeuse à microhématocrites à une vitesse de 11.000 tours/minute (12.500 g) et pendant 4 minutes. La lecture de l'hématocrite s'effectue à l'aide d'une abaque donnant le pourcentage du volume globulaire total.

Prélèvement des organes . Le foie et les reins sont prélevés dans les délais les plus brefs après le sacrifice, pesés et conservés au congélateur (-20°C) en vue de l'extraction des cobalamines.

Les contenus du tube digestif (intestin grêle et caecum) sont recueillis par entraînement mécanique et lavage à la pipette avec la quantité la plus petite possible d'une solution de

ClNa à 9 p.1000. L'ensemble du contenu et du liquide de lavage est gardé au congélateur. Il n'y a pas de pesée du contenu et, de ce fait, nous rapportons les résultats des dosages uniquement à la totalité de l'organe. Lorsqu'on étudie les populations microbiennes du caecum les dosages sont effectués sur une prise aliquote du contenu dilué et les résultats également rapportés à la totalité du caecum.

Le reste de la carcasse est conservé dans certains cas pour être analysé. Les rats font l'objet d'analyses du corps total sauf s'ils sont suffisamment grands pour permettre une étude séparée de leurs organes. Les portées à la naissance sont pesées et les extractions portent sur l'ensemble des rats.

5)- EXTRACTION DES COBALAMINES DES TISSUS ANIMAUX -

Nous avons déjà décrit dans la première partie de ce travail le mode d'extraction utilisé pour les contenus intestinaux. L'extraction des organes (reins et foie) ainsi que du corps entier des foetus se fait suivant des modalités similaires après avoir broyé la totalité de l'organe ou des foetus en milieu aqueux avec un homogénéiseur "Ultraturrax". On ajoute les quantités de cyanure de potassium et de tampon acide acétique-acétate selon les règles déjà décrites (1ère partie). On autoclave une demi-heure à 120°C, puis on ajuste à un volume proportionnel au poids frais de l'organe. Nous insistons sur ce problème de la dilution en fonction du poids des échantillons; en effet, l'extraction peut entraîner des composés qui sont stimulants ou inhibiteurs de la croissance des microorganismes-test, d'où le risque d'influer diversement sur les résultats si les extraits à comparer ne correspondent pas à la même quantité de tissu. C'est pourquoi nous avons adopté pour chaque tissu un rapport de dilution de l'échantillon qui est fonction de la teneur habituelle des cobalamines. Ainsi la dilution sera plus grande pour les reins que pour le foie.

Le traitement des carcasses des rats nécessite des légères modifications à notre façon de faire : les rats entiers (déduction faite des divers prélèvements) sont hachés dans un broyeur "Robot-Coupe" et deux ou plusieurs prises échantillon servent à l'extraction et au dosage.

Nous ne reviendrons pas sur les modalités des dosages des cobalamines totales et de la vitamine B12 : à partir des solutions obtenues les techniques employées sont identiques à celles utilisées pour l'étude du pouvoir de synthèse des souches bactériennes exposées dans la première partie de ce travail.

II - EFFETS DE LA CARENCE B12 CHEZ LES RATS NORMAUX OU =====

AXENIQUES DE PREMIERE GENERATION ET SUR LEURS PORTEES -

=====

Pour étudier les effets de la carence B12 nous avons soumis divers lots de rats normaux (à flore microbienne autochtone) ou axéniques, mâles et femelles, aux régimes précédemment décrits. Nous avons pris ces rats au sevrage ayant reçu leur allaitement d'une mère maintenue à un régime non carencé, ce qui fait que nous avons commencé nos recherches avec des ratons ayant des réserves normales de vitamine B12. Ces rats de première génération ont été accouplés et notre étude s'est étendue à la première et à la seconde portée.

Nous traiterons successivement des effets d'un régime partiellement carencé ou "subcarencé" puis de ceux d'un régime totalement carencé.

1)- REGIME SUBCARENCE A BASE DE CASEINE DEVITAMINEE

Protocole expérimental . Notre étude s'est poursuivie pendant 5 mois à partir du sevrage. Elle comportait les lots expérimentaux suivants :

Croissance des rats ♂ au
régime subcarencé

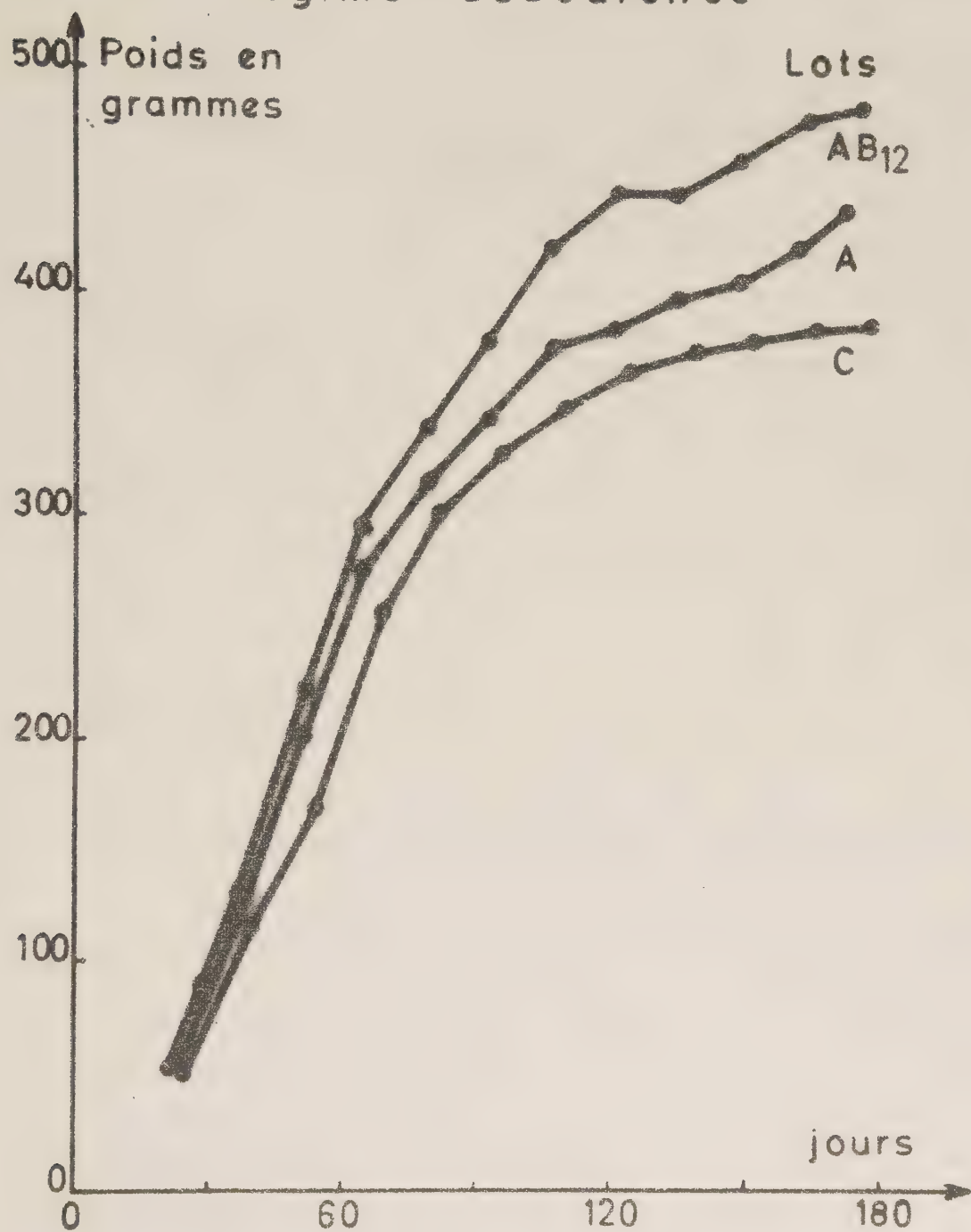


Figure 1

- TABLEAU-I -

Moyennes des gains de poids par jour des rats
au régime subcarencé
(en grammes)

Période	Lot A-B12	Différence par rap- port au lot A	Lot A	Différence par rap- port au lot A	Lot C
4ème semaine	<u>5,8</u>	+ 3 %	<u>5,6</u>	- 20 %	<u>4,3</u>
2ème mois	<u>5,9</u>	+ 5 %	<u>5,6</u>	- 18 %	<u>4,6</u>
3ème -	<u>3,3</u>	+ 14 %	<u>2,9</u>	+ 20 %	<u>3,5</u>
4ème -	<u>2,3</u>	+ 64 %	<u>1,4</u>	+ 35 %	<u>1,9</u>
5ème -	<u>0,6</u>	- 25 %	<u>0,8</u>	- 25 %	<u>0,6</u>
6ème -	<u>0,9</u>	- 35 %	<u>1,4</u>	- 78 %	<u>0,3</u>

Lot A-B12 - 5 rats axéniques recevant le régime subcarencé supplémenté en vitamine B12 au taux des régimes normaux utilisés dans notre élevage , soit à raison de 250 μ g par kg de régime,

Lot A - 11 rats axéniques au régime subcarencé dont 5 ont été sacrifiés au bout de cinq mois, les 6 restants ayant servi à une expérience de mono-contamination,

Lot C - 6 rats porteurs de leur flore intestinale spontanée dits normaux ou "conventionnels" au même régime.

Au cours de nos expériences nous n'avons jamais cherché à empêcher la coprophagie.

Contrôle de la carence en cours d'expérience .

Croissance pondérale . Les courbes moyennes de poids des rats de chaque lot se trouvent dans la FIGURE 1 ; nous avons transcrit dans le TABLEAU I les gains de poids moyens par rat et par jour pour chacun des trois lots ainsi que les différences en pourcentage de ces gains par rapport au lot A.

- FIGURE 1 -

Croissance des rats mâles en régime subcarencé

- TABLEAU I -

Moyennes des gains de poids par jour des rats au régime subcarencé

Les différences que l'on constate dans la moyenne des poids des rats axéniques et des rats normaux sont conformes à ce que l'on sait de ces deux types de rats en dehors de toute carence. Le rat axénique (ainsi que le rat "sans germes pathogènes") présente des gains de poids supérieurs à ceux du rat normal. et sa croissance maximale à âge égal est aussi supérieure.

Les différences entre les lots A et C sont sans doute à mettre sur le compte de la flore microbienne laquelle aurait normalement par ses germes pathogènes un effet dépressif sur la

croissance . D'après le TABLEAU I cet effet se ferait surtout sentir chez le jeune raton au cours des 1er et 2ème mois d'âge.

L'action d'un excès de vitamine B12 par rapport au besoin (lot AB12) se fait sentir surtout au cours du jeune âge. Toutefois la différence de gain de poids est faible et ne devient marquée qu'au cours du 4ème mois, s'inversant par la suite d'où un écart de croissance tendant à s'estomper. On peut conclure qu'une subcarence de vitamine B12 telle que la réalise un régime à base de caséine dévitaminée influence très peu la croissance pondérale du rat axénique.

Elimination fécale . Elle permet une évaluation de la grandeur des synthèses intestinales de cobalamines totales et de vitamine B12 chez les rats normaux mais aussi un contrôle de l'efficacité du régime chez les rats axéniques. Les résultats obtenus ont été rapportés à une élimination de 24 heures et leurs valeurs sont présentées dans le TABLEAU II dont la FIGURE 2 est l'expression graphique.

- TABLEAU II -

Elimination fécale moyenne de cobalamines et de la vitamine B12 des rats au régime subcarencé

Elimination fécale moyenne de 6 rats du lot A monocontaminés par une souche pure de Veillonella

- FIGURE 2 -

Elimination fécale moyenne des cobalamines et de la vitamine B12

Les dosages faits au moment du sevrage n'indiquent que peu de différence dans l'élimination fécale de la vitamine B12 et des cobalamines sauf en ce qui concerne le lot A-B12 qui, au départ, accuse les valeurs les plus faibles. Par la suite les lots se différencient. Chez le Rat à microflore autochtone l'élimination des cobalamines totales augmente considérablement avec le temps, alors que celle de la cyanocobalamine aura tendance à diminuer (lot C). Chez l'animal axénique l'excrétion fécale se réduit à mesure que l'expérience continue et au 5ème mois il y a un écart con-

= TABLEAU II -

Elimination fécale moyenne des cobalamines et de la vitamine B12
des rats au régime subcarencé

Rats	Cobalamines en $\mu\text{g}/24$ heures							
	Mois de régime							
	Nombre	Sevrage	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	
Lot A-B12	5	180	642	1043	874	1048	1199	
Lot A	11	390	238	189	54	45	70	
Lot C	6	420	994	1827	2044	2548	4300	
	Vitamine B12 en $\mu\text{g}/24$ heures							
	Lot A-B12	5	170	740	980	1186	1436	1188
	Lot A	11	200	128	27	7	10	9
	Lot C	6	230	152	142	122	165	156

Elimination fécale moyenne de 6 rats du lot A monocontaminés par une
souche pure de Veillonella

	Mois de régime			
	6ème		7ème	
	2ème	4ème	6ème	8ème
Semaine après la contamination				
Cobalamines en $\mu\text{g}/24$ heures	95	238	681	1085
Vitamine B12 en $\mu\text{g}/24$ heures	11	39	158	215

mg/24 heures ELIMINATION FÉCALE MOYENNE

DES COBALAMINES (1)
ET DE LA
VITAMINE B₁₂ (2)

Lots Rats (1) (2)
C : normaux ---
A-B₁₂ : axéniques ---
+ vitamine B₁₂ ---

A : axéniques ---
↓ V : ensemencés avec Veillonella

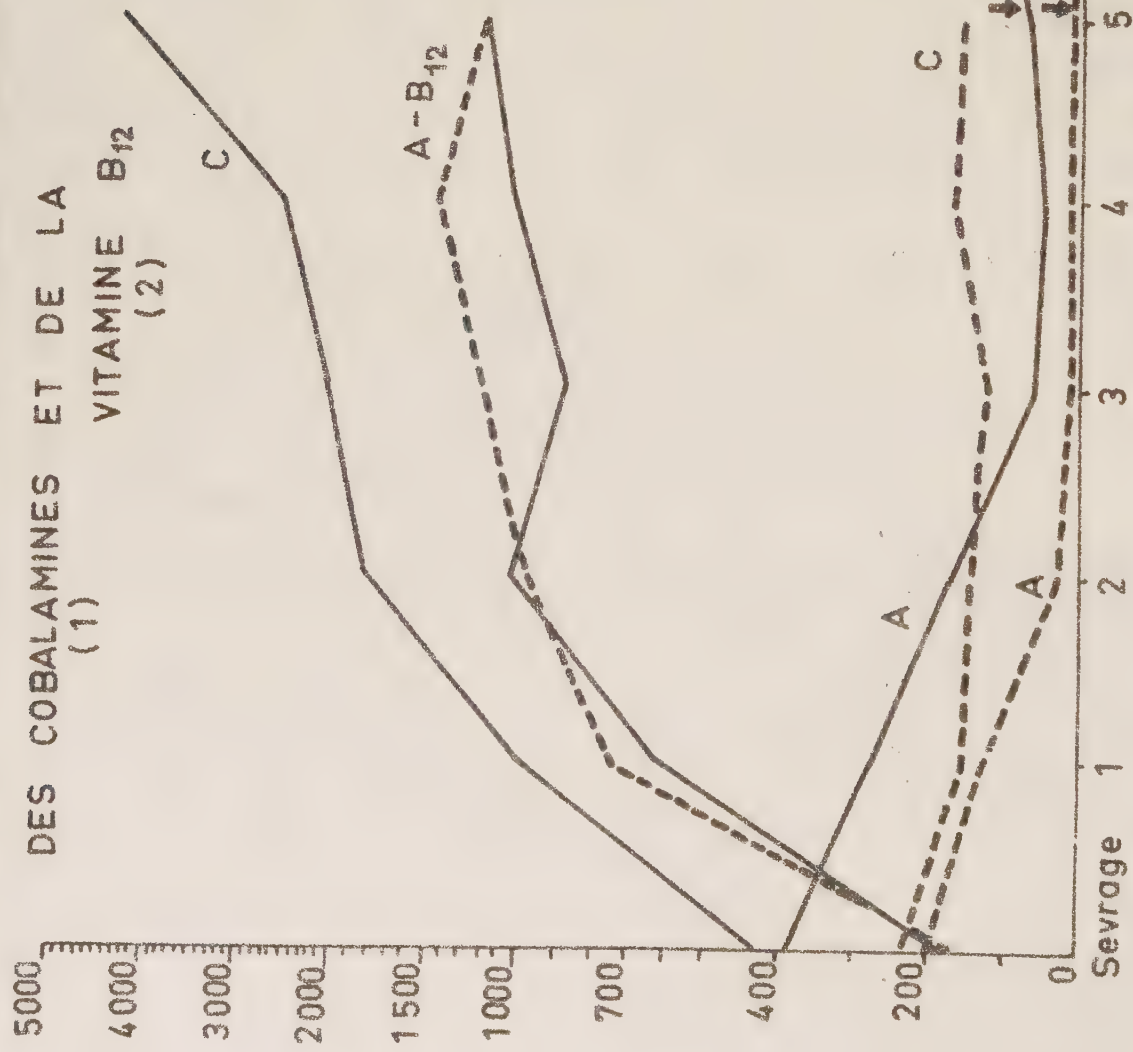


Figure 2

sidérable entre le lot C et le lot A. Les animaux du lot A-B12 ont une évolution inverse de celle du lot A en ce sens que l'élimination fécale des cobalamines est, par jour, beaucoup plus élevée en fin d'expérience qu'au début.

Que peut-on en conclure ? La preuve d'une synthèse réalisée par la flore digestive ressort avec évidence de la comparaison des lots C et A. Toutefois il faut souligner que chez le rat normal cette synthèse affecte beaucoup plus les cobalamines totales que la vitamine B12 proprement dite. Enfin, les résultats fournis par le lot A-B12 laissent à penser qu'un apport vitaminique largement suffisant pour couvrir le besoin permet la mise en réserve d'une grande partie de la vitamine B12 ingérée (1 μ g de vitamine excrété au maximum par rat et par jour pour une ingestion moyenne de 5 μ g). Dans ce lot les valeurs parfois légèrement supérieures de vitamine B12 par rapport aux cobalamines "totales " nous incitent à rappeler qu'il s'agit ici de dosages microbiologiques: en présence de vitamine B12 comme seule cobalamine, O. malhamensis est plus "sensible" que E. coli.

(Effet d'une contamination par une souche productrice de cobalamines-B12 sur l'élimination fécale du rat axénique (lot A)). Une souche de Veillonella a été introduite par sonde oesophagienne chez 6 rats axéniques au régime subcarencé depuis 5 mois. L'implantation de cette bactérie a été réussie, ce qui a été démontré par RAIBAUD et coll. (150) au moyen de dénombrements bactériens de l'estomac et du caecum. Sans sacrifice des animaux, nous en avons eu une preuve indirecte plus rapide en mettant en évidence l'augmentation progressive des synthèses de cobalamines et de vitamine B12 dans les fèces (TABLEAU II). Nous remarquerons qu'en 2 mois le pouvoir de synthèse de cette monoflore est devenu égal, pour ce qui concerne la vitamine B12, à celui des rats à flore autochtone (Lot C).

Signes hématologiques . Des numérations du sang périphérique ont donné les valeurs qui figurent ci-dessous :

<u>Rats</u>	<u>Moyenne du nombre d'hématies en</u>		
	<u>millions/mm³</u>		
Lot A-B12	10,2	+	0,6 ^(*)
Lot A	10,5	+	0,4
Lot C	9,0	+	0,3

Chez le rat axénique, il n'y a pas de différence significative du nombre des hématies sous l'action du régime subcarencé (lots A et A-B12). L'écart entre le lot A et le lot C s'explique peut-être par les résultats de GORDON et coll. concernant les teneurs en hématies légèrement plus élevées chez le rat axénique (161). A noter que le nombre de rats sacrifiés pour le lot A n'a été que de 5 sur 11, les autres rats ayant subi la monocontamination par Veillonella sans que cela influe, d'ailleurs, sur leur numération globulaire.

A ce stade de la carence on ne voit donc aucun signe qui tende à faire supposer l'installation d'une anémie.

Réserves en cobalamines et vitamine B12. Contenus de l'intestin grêle et du caecum.

Nous avons analysé ces contenus en vue de les comparer aux valeurs obtenues pour l'élimination fécale. Le TABLEAU III montre que les contenus intestinaux du lot A présentent des teneurs vitaminiques très inférieures à celles des lots C et A-B12, les différences étant beaucoup plus marquées pour la vitamine B12 que pour les cobalamines totales. Ainsi grâce à la présence de la flore intestinale (lot C) les contenus intestinaux sont environ quinze fois plus riches en vitamine B12 que chez les rats axéniques (lot A), tandis que les valeurs pour les cobalamines totales sont seulement 2-3 fois plus grandes. Les contenus intestinaux du lot C présentent même des valeurs supérieures à celles des rats axéniques largement supplémentés en vitamine B12 (lot A-B12), sauf en ce qui concerne la vitamine B12 du caecum.

(*)- +5 m, écart-type de la moyenne que nous donnerons de façon systématique pour cette expérience.

- TABLEAU III -

Contenus de l'intestin grêle et du caecum des Rats
au régime subcarencé

		<u>Cobalamines</u>		<u>Vitamine B12</u>	
		(moyennes en $\mu\text{g} \pm \text{m}$)			
Rats	Nombre	Intestin grêle	Caecum	Intestin grêle	Caecum
Lot A-B12	5	135 $\pm$ 12	1020 $\pm$ 100	85 $\pm$ 8	560 $\pm$ 48
Lot A	5	110 $\pm$ 4	670 $\pm$ 42	7 $\pm$ 0,7	20 $\pm$ 3
Lot C	6	375 $\pm$ 22	1320 $\pm$ 124	110 $\pm$ 14	290 $\pm$ 34

Expérience de monocontamination par Veillonella

<u>Lot A + Veillonella</u>	6	68 ± 9	770 ± 40	25 ± 3	510 ± 20
--------------------------------	---	------------	--------------	------------	--------------

- TABLEAU III -

Contenus de l'intestin grêle et du caecum des Rats au régime subcarencé

Expérience de monocontamination par Veillonella

Ces résultats comparés à ceux de l'élimination fécale montrent que les proportions relatives des contenus intestinaux et des fèces sont les mêmes pour les trois lots en ce qui concerne la vitamine B12. Par contre les teneurs élevées en cobalamines des fèces du rat à microflore naturelle ne se retrouvent pas dans les contenus intestinaux. Cela laisse à penser que la biosynthèse des cobalamines analogues doit continuer de façon très active sur les matières fécales après défécation.

(Effet de la monoflore de Veillonella) . Le même TABLEAU III nous montre les valeurs atteintes par les cobalamines et la vitamine B12 du contenu intestinal lorsque s'y développe cette souche anaérobie stricte qui est parmi les meilleures productrices de cette vitamine. Il semble que cela ne modifie pas profondément les contenus en cobalamines totales ; la vitamine B12 par contre est très nettement augmentée, pas tellement dans l'intestin grêle que dans le caecum pour lequel nous trouvons presque les quantités du lot A-B12 recevant un excès en vitamine. Cette prépondérance caecale dans les synthèses de vitamine B12 confirme, d'ailleurs, l'observation de RAIBAUD et coll. (150) sur l'implantation basse de cette monoflore.

Contenus des reins et du foie.

Ils donnent une idée de l'importance des réserves. Le TABLEAU IV et la FIGURE 3 expriment les résultats obtenus après prélèvement de ces deux organes et dosages de leurs extraits.

- TABLEAU IV -

Contenus totaux, contenus pour 100 g de poids corporel et teneurs par g d'organe des Reins et du Foie des Rats au régime subcarencé

- FIGURE 3 -

Réserves des cobalamines et de la vitamine B12 des Rats au régime subcarencé

Dans tous les cas nous pouvons constater la prédominance des valeurs chez les rats supplémentés en vitamine B12, bien plus marquée d'ailleurs pour les reins que pour le foie. C'est un fait d'expérience constante au cours de notre travail : les reins sont par excellence l'organe où s'accumule la vitamine B12 en excès. Il est à noter que ce dépôt ne comporte pas de dégradation de la vitamine puisque toutes les valeurs du lot A-B12 obtenues par O. malhamensis sont équivalentes à celles des cobalamines totales. Les teneurs par gramme mettent encore plus en lumière cette spécialisation du tissu rénal.

Les comparaisons des valeurs relatives aux Rats au régime subcarencé ne permettent pas de conclusions concernant le rôle de la flore intestinale. Il semble que les réserves en vitamine B12 sont sensiblement les mêmes pour les lots A et C; elles sont très diminuées par rapport à celles des rats recevant un apport normal de vitamine: de 9/10èmes pour les reins et de 8/10èmes pour le foie.

Pour les cobalamines totales les quantités globales et les teneurs des reins semblent nettement plus élevées chez les rats axéniques. S'il y a une action de synthèse de la flore intestinale elle ne se fait pas sentir ici, bien au contraire. Cependant il ne faut pas oublier que les rats axéniques ont un poids moyen de 10 p.100 supérieur aux rats normaux. Les valeurs des contenus ramenées à 100 g de poids corporel rendent cette différence beaucoup moins importante (comparer les valeurs entre les lots A et C).

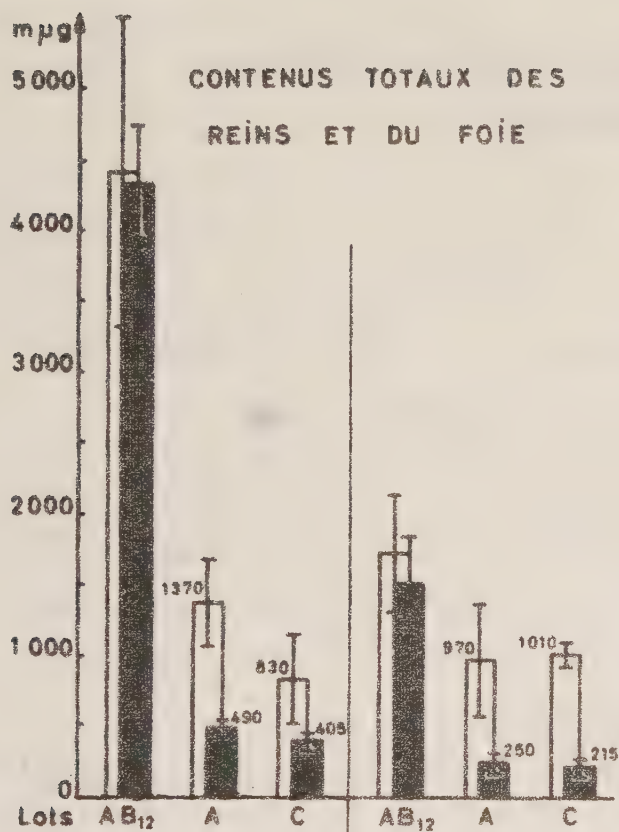
En conclusion, l'action d'un régime subcarencé maintenu pendant 5 mois se traduit surtout par une diminution très nette des réserves de l'animal et par un effondrement de l'élimination fécale de vitamine B12 ce qui semble indiquer que l'organisme s'adapte à la déficience du régime par une économie de ses dépenses. Par ailleurs aucun trouble ni clinique ni hématologique n'a pu être constaté.

(Effet de la monoflore de Veillonella) . Les importantes synthèses

- TABLEAU IV -

Contenus totaux des reins et du foie des Rats
au régime subcarencé

		<u>Cobalamines</u>		<u>Vitamine B12</u>	
(moyennes en $\mu\text{g} \pm \text{S.M.}$)					
Rats	Nombre	Reins	Foie	Reins	Foie
Lot A-B12	5	4400 $\pm$ 391	1720 $\pm$ 147	4330 $\pm$ 141	1510 $\pm$ 117
Lot A	5	1370 $\pm$ 111	970 $\pm$ 141	490 $\pm$ 25	250 $\pm$ 117
Lot C	6	830 $\pm$ 121	1010 $\pm$ 36	405 $\pm$ 26	215 $\pm$ 25
<u>Contenus des Reins et du Foie pour 100g de poids corporel</u>					
Lot A-B12	5	913 $\pm$ 72	359 $\pm$ 34	900 $\pm$ 36	313 $\pm$ 20
Lot A	5	318 $\pm$ 23	230 $\pm$ 39	114 $\pm$ 8	58 $\pm$ 5
Lot C	6	221 $\pm$ 38	283 $\pm$ 55	108 $\pm$ 8	55 $\pm$ 7
<u>Teneurs des Reins et du Foie par g d'organe</u>					
Lot A-B12	5	1853 $\pm$ 159	144 $\pm$ 15	1823 $\pm$ 80	125 $\pm$ 9
Lot A	5	608 $\pm$ 29	94 $\pm$ 17	219 $\pm$ 16	23 $\pm$ 2
Lot C	6	381 $\pm$ 74	94 $\pm$ 5	178 $\pm$ 10	19 $\pm$ 2



RÉSERVES DES COBALAMINES
ET DE LA VITAMINE B₁₂
DES RATS AU RÉGIME SUB-
CARENCE .



intervalle de confiance de la
moyenne d'après le test t
($P \leq 0,05$)

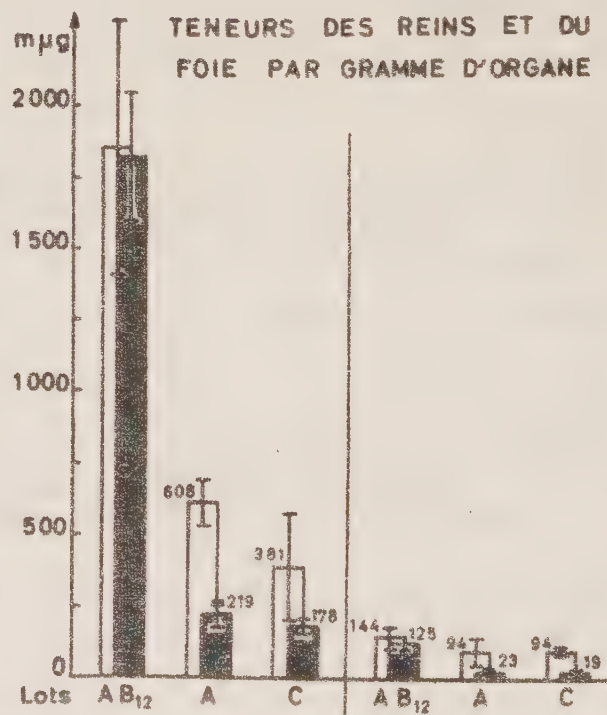
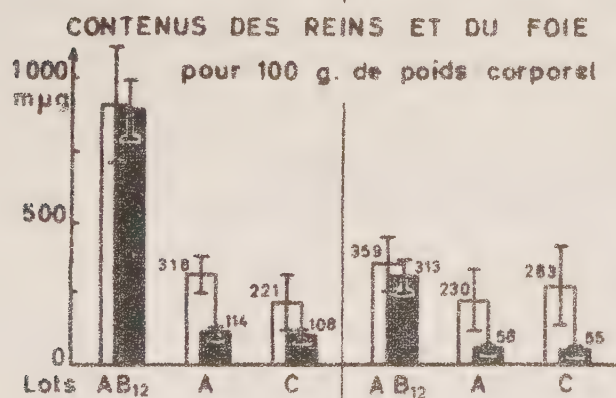


Figure 3

se de vitamine B12 au niveau du caecum semblent apporter une modification positive mais modérée aux réserves basses des rats au régime subcarencé. Voici quelques données comparées des contenus totaux des reins et du foie :

- Vitamine B12 en µg -

	<u>Reins</u>	<u>Foie</u>
<u>Lot A.</u>	490 ± 25	250 ± 28
<u>Lot A. + Veillonella</u>	543 ± 23 (+ 11%)	340 ± 14 (+36%)

Il est probable qu'une expérience analogue menée sur des rats aux réserves beaucoup plus basses serait susceptible de montrer une plus grande efficacité. A la limite on devrait pouvoir contrecarrer les effets d'un régime totalement carencé par la seule implantation d'une monoflore aux synthèses actives de vitamine B12.

2)- REGIME CARENCE A BASE DE FARINE DELIPIDEE DE SOJA

A)- Etude du Rat en croissance -

La conduite des essais a été en tous points semblable à celle de l'expérience précédente sauf que nous avons utilisé à la fois des rats mâles et femelles (en vue de leur reproduction). Leur durée a été de cinq mois à partir du sevrage.

Protocole expérimental- Nous avons constitué les lots expérimentaux suivants :

Lot A-B12 : 5 Rats mâles axéniques au régime carencé recevant un supplément de 250 µg de vitamine B12 de régime,

Lot A : 11 Rats mâles et 5 Rats femelles axéniques au régime strictement carencé. La moitié des Rats mâles était destinée à une expérience de monococontamination qui n'a pas été réalisée,

Lot C : 7 Rats mâles et 5 Rats femelles à flore autochtone dits "conventionnels" au même régime que les précédents.

A la fin de l'expérience tous les rats ont été sacrifiés, après prélèvement de sang périphérique, suivant les mêmes modalités que précédemment.

Contrôle de la carence en cours d'expérience -

Croissance pondérale . Les moyennes des poids des rats au régime carencé sont représentées par les courbes de la FIGURE 4. La comparaison de ces courbes révèle des différences très nettes entre les lots de rats axéniques et "conventionnels" aussi bien mâles que femelles. Les gains de poids moyens par rat et par jour et leurs différences par rapport au lot A ont été transcrits dans le TABLEAU V.

- FIGURE 4 -

Croissance des rats en régime carencé

- TABLEAU V -

Moyennes des gains de poids par jour des Rats en régime carencé

La différence entre les lots A et C est plus marquée ici que lors de l'expérience précédente et on ne peut encore qu'invoquer l'effet dépressif de la flore microbienne sur la croissance du jeune rat (161). Après 5 mois de régime les rats axéniques mâles ont en moyenne un poids de 40 p.100 supérieur à ceux ayant une flore microbienne. Cette différence oscille entre 35 et 40 p.100 en ce qui concerne les rats femelles après 3 mois de régime (les pesées ont été interrompues pendant les gestations). Les différences de gain de poids sont en général importantes chez le jeune rat mais tendent à s'estomper au cours du 2ème mois chez les mâles, du 3ème chez les femelles.

Par contre nous assistons à une croissance presque identique pour les lots A et A-B12 mâles (contrairement à la première ex-

Croissance des rats au régime carencé

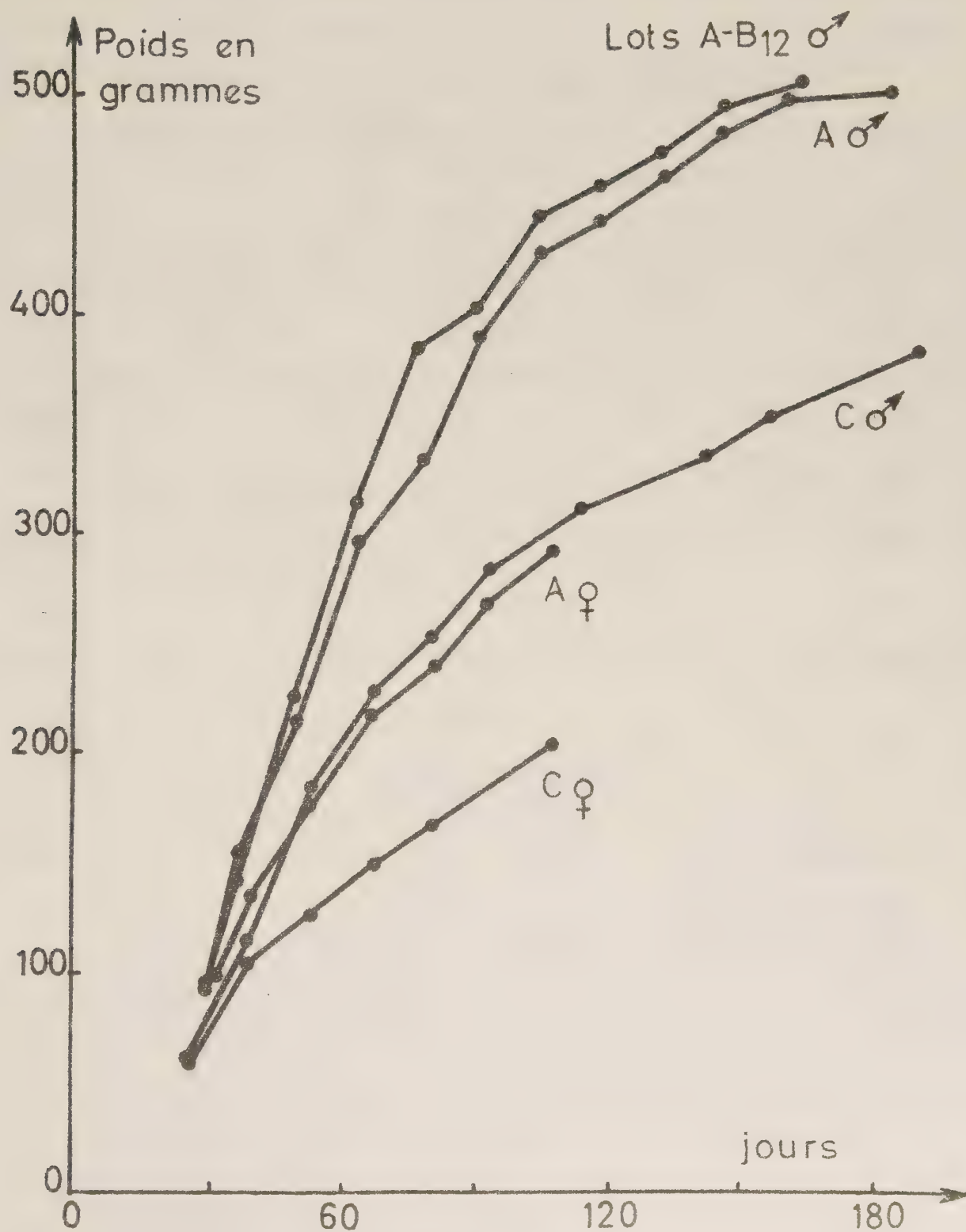


Figure 4

- TABLEAU V -

Moyennes des gains de poids par jour des Rats
au régime carencé
(en grammes)

Rats MALES					
Période	Lot A-B12	Différence par rap- port au lot A	Lot A	Différence par rap- port au lot A	Lot C
4ème semaine	<u>6,7</u>	- 8 %	<u>7,3</u>	- 42 %	<u>4,2</u>
2ème mois	<u>5,6</u>	+ 30 %	<u>4,3</u>	+ 2 %	<u>4,4</u>
3ème -	<u>3,7</u>	- 7 %	<u>4,0</u>	- 40 %	<u>2,4</u>
4ème -	<u>2,1</u>	+ 10 %	<u>1,9</u>	- 21 %	<u>1,5</u>
5ème -	<u>1,3</u>	- 13 %	<u>1,5</u>	- 33 %	<u>1,0</u>
6ème -	<u>0,6</u>	+ 20 %	<u>0,5</u>	- 80 %	<u>0,9</u>
RATS FEMELLES					
4ème semaine			<u>5,1</u>	- 37 %	<u>3,2</u>
2ème mois			<u>3,8</u>	- 44 %	<u>2,1</u>
3ème -			<u>1,9</u>	- 15 %	<u>1,6</u>
4ème -			<u>2,1</u>	- 71 %	<u>0,6</u>

périence, mais les sources protéiques des régimes subcarencé et carencé sont différentes ce qui semble confirmer, en tout cas, que l'absence totale de vitamine B12 de la ration alimentaire n'a aucune incidence sur la croissance des rats de première génération.

Elimination fécale . Les dosages effectués sur les fèces de 24 heures aboutissent à des résultats semblables à ceux de l'expérience au régime subcarencé , c'est-à-dire à une diminution rapide de l'élimination des cobalamines et de la vitamine B12 pour ce qui est des rats axéniques en carence totale (lot A) et donc à la mise en place des conditions de l'avitaminose. Bien entendu les fèces des rats à microflore présentent toujours des teneurs élevées en cobalamines totales.

Signes hématologiques . Nous avons pratiqué des numérations du sang périphérique aussi bien chez les Rats mâles que chez les femelles. Nous avons obtenu les résultats suivants :

<u>Rats</u>	<u>Moyenne du nombre d'hématies en millions/mm³</u>	
	<u>mâles</u>	<u>femelles</u>
LOT A-B12	10,1 ± 0,3	
LOT A	10,2 ± 0,3	9,6 ± 0,1
LOT C	9,2 ± 0,2	9,1 ± 0,1

Même chez les rats sans flore intestinale (Lot A) le régime carencé n'engendre aucune tendance à l'anémie ce qui confirme nos observations précédentes, les moyennes des concentrations en globules rouges chez les rats porteurs de leur microflore autochtone (Lot C) sont toujours inférieures à celles des rats axéniques s'il s'agit des mâles mais l'écart est moins grand entre les lots femelles.

Par ailleurs, la présence de quantités considérables de vitamine B12 dans le régime (lot A-B12) n'exerce, pas plus qu'avec le

régime à base de caséine dévitaminée, aucun effet sur le nombre moyen de globules rouges de ces rats. Au surplus les valeurs moyennes restent sensiblement les mêmes pour chaque lot de rats mâles d'une expérience sur l'autre.

Contenus intestinaux et réserves en cobalamines et vitamine B12

Contenus de l'intestin grêle et du caecum. Le TABLEAU VI rapporte les teneurs des contenus en cobalamines et en vitamine B12. Les résultats sont en accord avec ce que l'on pouvait attendre des effets du régime alimentaire suivant qu'on s'adresse à des rats axéniques ou à des rats à microflore d'origine: en ce qui regarde la cyanocobalamine le lot A-B12 présente les valeurs les plus fortes ; les lots A (mâles et femelles) les valeurs les plus faibles et les lots C des valeurs intermédiaires. Nous remarquerons, en outre, que dans le caecum la quantité de cobalamines totales est plus élevée dans le lot C que dans le lot A-B12 tandis que la quantité de vitamine B12 ne lui est que faiblement inférieure. Cela indique bien le degré d'intensité des synthèses caecales par la microflore du Rat normal placé à un régime totalement carencé.

- TABLEAU VI -

Contenus de l'intestin grêle et du caecum des Rats au régime carencé

Contenus des Reins et du Foie. Les quantités de cobalamines et de vitamine B12 des reins et du foie figurent au TABLEAU VII ; les résultats sont exprimés en contenus totaux, en contenus pour 100 g de poids corporel et en teneurs par gramme.

- TABLEAU VII -

Contenus totaux, contenus pour 100 g de poids corporel et teneurs/g des Reins et du Foie des Rats au régime carencé

- FIGURE 5 -

Réserves de cobalamines et de vitamine B12 des Rats au régime carencé

- TABLEAU VI -

Contenus de l'intestin grêle et du caecum des Rats
au régime carencé

		<u>Cobalamines</u>		<u>Vitamine B12</u>	
		(moyennes en $\mu\text{g} \pm \text{m}$)			
Rats mâles	Nombre	Intestin grêle	Caecum	Intestin grêle	Caecum
Lot A-B12	5	233 $\pm$ 11	1162 $\pm$ 33	139 $\pm$ 14	830 $\pm$ 54
Lot A	11	52 $\pm$ 5	51 $\pm$ 5	6 $\pm$ 1,0	30 $\pm$ 2,3
Lot C	7	117 $\pm$ 32	2982 $\pm$ 365	19 $\pm$ 4,5	569 $\pm$ 140
<u>Rats femelles</u>					
Lot A	5	50 $\pm$ 3,8	147 $\pm$ 8	7 $\pm$ 0,9	16 $\pm$ 1,2
Lot C	5	122 $\pm$ 37	3260 $\pm$ 426	21 $\pm$ 2,8	470 $\pm$ 57

- TABLEAU VII -

Contenus totaux des reins et du foie des Rats
au régime carencé

		Cobalamines		Vitamine B12	
		(moyennes en $\mu\text{g} \pm \text{S.E.}$)			
Rats	Nombre	Reins	Foie	Reins	Foie
Lot A-B12	♂ 5	4812 $\pm$ 295	1582 $\pm$ 82	5422 $\pm$ 345	1190 $\pm$ 173
Lot A	♂ 11	1090 $\pm$ 23	759 $\pm$ 27	179 $\pm$ 20	202 $\pm$ 10
Lot C	♂ 7	1176 $\pm$ 8	862 $\pm$ 40	393 $\pm$ 36	331 $\pm$ 42
Lot A	♀ 5	1012 $\pm$ 48	742 $\pm$ 26	247 $\pm$ 14	230 $\pm$ 23
Lot C	♀ 5	1086 $\pm$ 21	787 $\pm$ 47	299 $\pm$ 26	293 $\pm$ 8
Contenus des reins et du foie p.100 de poids corporel					
Lot A-B12	♂ 5	955 $\pm$ 62	313 $\pm$ 14	1077 $\pm$ 80	234 $\pm$ 31
Lot A	♂ 11	219 $\pm$ 7	153 $\pm$ 7	36 $\pm$ 1,5	41 $\pm$ 1,9
Lot C	♂ 7	310 $\pm$ 10	226 $\pm$ 8	102 $\pm$ 7	87 $\pm$ 11
Lot A	♀ 5	312 $\pm$ 16	230 $\pm$ 11	77 $\pm$ 5	71 $\pm$ 7
Lot C	♀ 5	474 $\pm$ 12	343 $\pm$ 21	130 $\pm$ 9	128 $\pm$ 5
Teneurs des reins et du foie par g d'organe					
Lot A-B12	♂ 5	1743 $\pm$ 102	139 $\pm$ 8,4	1963 $\pm$ 122	106 $\pm$ 18
Lot A	♂ 5	383 $\pm$ 15	60 $\pm$ 3,1	63 $\pm$ 8	16 $\pm$ 0,9
Lot C	♂ 7	507 $\pm$ 10	72 $\pm$ 2,6	167 $\pm$ 11	28 $\pm$ 4
Lot A	♀ 5	438 $\pm$ 41	82 $\pm$ 7,2	107 $\pm$ 12	26 $\pm$ 4
Lot C	♀ 5	644 $\pm$ 35	89 $\pm$ 7,5	177 $\pm$ 16	33 $\pm$ 1,5

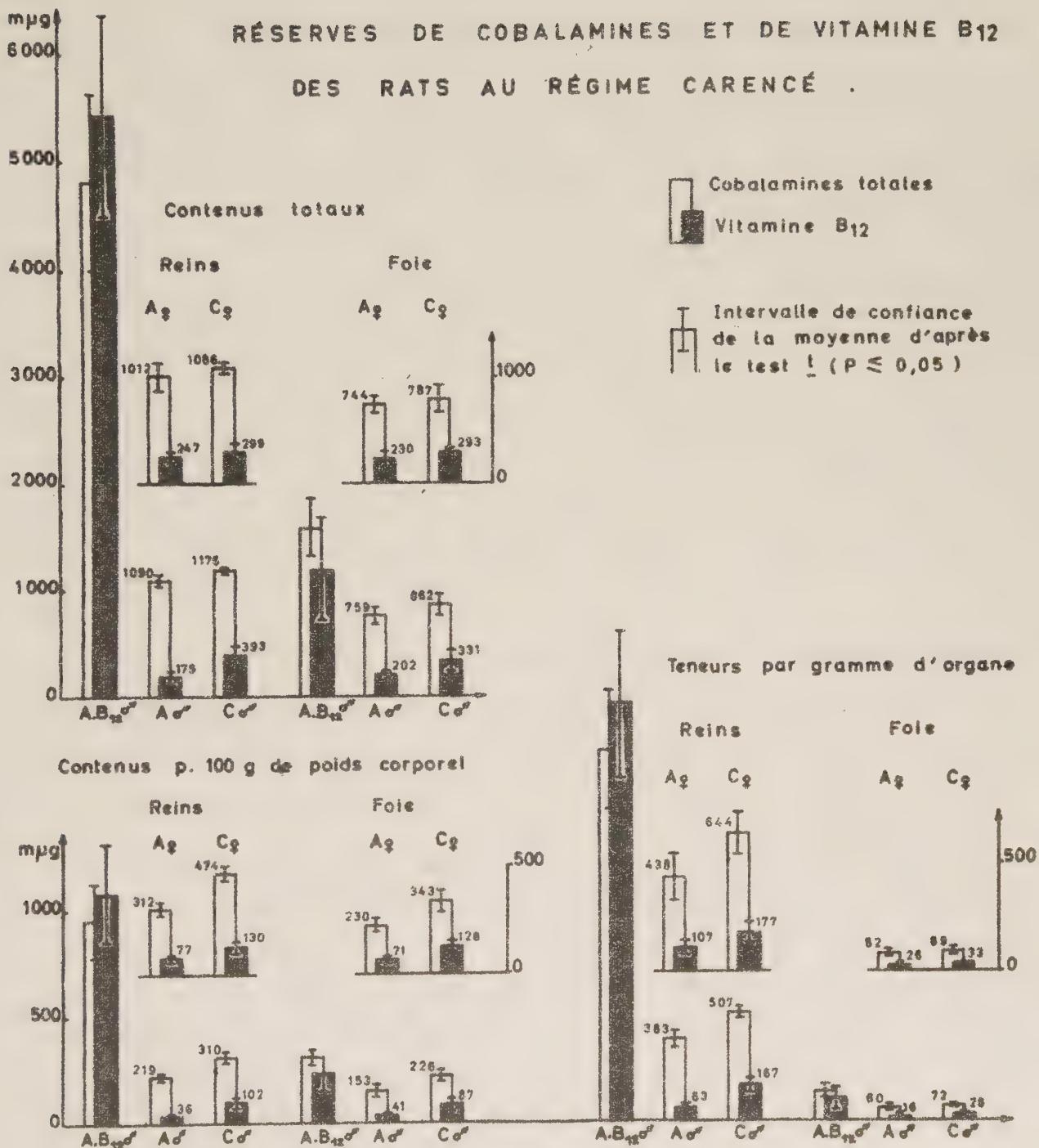


Figure 5

En ce qui concerne le lot A-B12 nous remarquerons simplement que le niveau de ces réserves est tout à fait semblable à celui observé dans le cas du régime à la caséine dévitaminée (expérience précédente).

En régime totalement carencé les différences des réserves de vitamine B12 sont évidentes entre les lots A et C mais elles sont beaucoup plus marquées chez les mâles que chez les femelles (Contenus totaux , TABLEAU VII et FIGURE 5). Les différences entre les mâles des lots A et C atteignent 100 p.100 pour les reins et seulement 50 p.100 pour le foie. L'écart pour les cobalamines totales, bien que net, est beaucoup moins important. On voit déjà là l'effet évident de la présence de la flore microbienne.

Or, ces différences sont bien plus accentuées si nous rapportons ces réserves à l'unité de poids vif. En effet pour que la comparaison des réserves soit entièrement valable il faut qu'elles correspondent à des animaux de même poids. Voici les poids moyens vifs au moment du sacrifice :

	<u>Rats mâles</u>	<u>Rats femelles</u>
Lot A-B12	505	
Lot A	500	325
Lot C	382	230

Nous avons donc calculé l'importance des réserves des reins et du foie rapportée à 100 g du poids corporel de chaque rat. Les résultats sont exprimés dans le TABLEAU VII et la FIGURE 5 (contenus pour 100 g). Le contenu des reins en vitamine B12 est beaucoup plus important chez les rats à flore microbienne que chez les axéniques, surtout chez les mâles pour qui les réserves sont triples alors que la différence n'atteint que 70 p.100 chez les femelles. En ce qui concerne le foie, l'avantage est toujours aux rats normaux : les réserves sont deux fois plus grandes pour les mâles et supérieures de 80 p.100 pour les femelles. Ainsi que nous l'avions déjà noté, les cobalamines totales varient dans le même sens qu'il s'agisse des reins ou du foie, des rats mâles ou des femelles, mais les écarts sont moins marqués que pour la vitamine B12 .

Nous devons faire une remarque à propos des comparaisons des valeurs suivant les sexes. Au moment du sacrifice les rattes axéniques carencées (lot A) avaient mangé tout ou partie de leur progéniture dans les 48 heures après la mise-bas : elles ont ainsi récupéré une partie de la vitamine B12 prélevée par la portée. Il se pourrait donc que chez les femelles du lot A les pertes de vitamine B12 dues aux gestations soient beaucoup moins grandes que chez les femelles du lot C qui n'ont pas dévoré leur portée. Si nous avions pu faire le sacrifice des deux lots de rattes dans les mêmes conditions nous aurions eu sans doute pour les réserves de vitamine B12 des écarts supérieurs aux 70- 80 p.100 signalés ci-dessus. Nous noterons aussi que les réserves de cobalamines totales et de vitamine B12 sont toujours plus élevées chez les femelles que chez les mâles du lot correspondant : pour la vitamine B12 l'écart est sensiblement du double dans le lot A, il varie de 30 à 50 p.100 dans le lot C. Peut-être faudrait-il relier ce fait aux importantes synthèses d'acides nucléiques nécessitées par la spermatogénèse chez le mâle, l'arrêt de notre expérimentation ayant eu lieu après les périodes d'accouplement.

Si nous considérons les teneurs par gramme d'organe, (reins et foie, TABLEAU VII, FIGURE 5), nous pouvons dégager pour les lots A et C des conclusions analogues aux précédentes. Mais les différences sont ici considérablement moins importantes pour le foie que pour les reins. Ce qui confirme que ces derniers sont le lieu électif des réserves. Il s'ensuit que les reins, qui peuvent accumuler les quantités de cobalamines-B12 les plus importantes par g de tissu, sont également capables de subir de fortes diminutions: les écarts entre les lots A et A-B12 sont de 78 p.100 pour les cobalamines et de 97 p.100 pour la vitamine B12. Pour le foie non seulement les teneurs sont normalement de l'ordre du 1/10ème ou du 1/20ème de celles du rein mais les variations sont aussi plus faibles (de 57 p.100 pour les cobalamines à 85 p.100 environ pour la vitamine B12 entre les lots A-B12 et A).

Il en est de même pour les effets de la flore intestinale : entre les lots A et C les écarts en valeur absolue et en pourcentage

sont plus importants dans les reins.

Différence des teneurs par gramme (lot C- lot A)

	<u>Cobalamines</u>		<u>Vitamine B12</u>	
	<u>Reins</u>	<u>Foie</u>	<u>Reins</u>	<u>Foie</u>
<u>Rats mâles</u>	+ 24 p.100	+ 20 p.100	+ 165 p.100	+ 75 p.100
<u>Rats femelles</u>	+ 47 p.100	+ 9 p.100	+ 65 p.100	+ 27 p.100

Il est net que les différences affectent davantage les reins que le foie. Nous pensons que le tissu rénal doit permettre une conservation de la vitamine sous forme labile et mobilisable tandis que dans le tissu hépatique elle serait davantage liée à la cellule.

Si nous voulons tirer une conclusion partielle de l'action du régime carencé nous dirons qu'il affecte très grandement les réserves de vitamine B12 sans qu'il entraîne apparemment aucun signe clinique de carence : la croissance et les signes hématologiques sont normaux. Il serait juste de préciser que cet effondrement des réserves survient non seulement à la suite d'un régime beaucoup plus sévère que le précédent mais aussi chez des animaux dont les dépenses ont été intensifiées par l'épreuve de la reproduction.

B)- Etude de la reproduction -

Les 5 femelles et quelques mâles de chacun des lots A et C ont servi à une expérience sur la reproduction après 4 mois de régime totalement carencé. Nous avons vérifié que ce régime à base de farine de tourteau de soja délipidé était parfaitement apte à assurer une reproduction normale chez les rats axéniques s'il était convenablement supplémen-té en vitamine B12 (et nous savons que les quantités de vitamine B12 habituellement ajoutées aux rations alimentaires dans notre élevage sont très largement excédentaires par rapport aux besoins).

Gestation -

Au premier accouplement toutes les femelles axéniques (lot A) et toutes celles à microflore autochtone (lot C) sont devenues gestantes. Il y a eu un avortement dans chaque lot.

Au deuxième accouplement, sur 4 femelles axéniques restant en vie il y a eu une absence de gestation apparente, deux avortements et une seule mise-bas, cette dernière correspondait à une femelle ayant avorté la première fois et n'ayant donc pas subi de perte de ses réserves de vitamine B12 du fait de la mise-bas. Ces résultats ne peuvent être comparés avec ceux des femelles du lot C pour lesquelles une nouvelle gestation n'a été tentée que dans 2 cas sur 5 (sur les 3 autres femelles deux ont été sacrifiées après la mise-bas et la troisième au sevrage de sa portée). Pour le deuxième accouplement des 2 femelles restant en vie il y a eu une mise-bas normale et une récurrence d'avortement.

L'ensemble de ces résultats et ceux concernant le sort des portées est transcrit dans le TABLEAU VIII.

- TABLEAU VIII -

Gestation et viabilité des portées des rattes normales ou axéniques
au régime totalement carencé

Viabilité des portées -

Ce tableau montre que la mortalité des rats axéniques est d'environ 50 p.100 le premier jour. Chez les 3 premières rattes il n'y a pas eu de survivants au bout de 48 heures. Dans le cas de la ratte n° 5 les rats survivants et 4 rats ayant été trouvés morts ont servi à des analyses des contenus en cobalamines et en vitamine B12. Dans l'ensemble il y a donc eu 35 rats morts ou disparus dans les 48 heures soit une mortalité de 100 p.100 en ne tenant pas compte des 5 rats sacrifiés délibérément. Il va de soi que cette mortalité est tout à fait anormale comparée aux résultats de notre élevage de rats axéniques non carencés.

- TABLEAU VIII -

Gestation et viabilité des portées des rattes normales
ou axéniques au régime totalement carencé

Rattes	1er Accouplement					2ème Accouplement				
	Gesta- tion	Mise- bas	Nombre de ratons	Mortalité de		Gesta- tion	Mise- bas	Nombre de ratons	Mortali- té	
				24h	48h				24h	
lot A n°1	+	+	9	2	9	-	-	-	-	-
2	+	+	10	10	10	+	-	-	-	-
3	+	+	11	4	11	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	+	+	12	4(*)	-
5	+	+	10	5(*)	-					
total			40	21/40 (52%	30/30 (soit) 100%			12	4/12 (soit) 33%	
lot C n°1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	8	0	0(**)					
3	+	+	8	0(*)	-					
4	+	+	8	2(*)	-					
5	+	+	7	0	0	(***)				
total			31	2/31 (6%	0/15 (soit) 0%					

(*)Ratons survivants sacrifiés avec la mère aux fins d'analyse

(**) Ratons survivants sacrifiés au sevrage

(***)Mère sacrifiée au sevrage de la première portée

L'absence de gestation et l'avortement ont tendance à devenir la règle lors du deuxième accouplement. Dans le seul cas de la femelle n° 4, qui avait avorté la première fois, il y a eu une mise-bas normale mais avec une mortalité de 33 p.100 le premier jour. Les ratons survivants de 24 heures ont été sacrifiés aux fins d'analyse de crainte, depuis l'expérience des premières gestations, de ne pouvoir les garder en vie.

Dans la mesure où il nous a été possible d'observer les ratons survivants du premier jour nous n'avons remarqué aucune malformation ou monstruosité qui aurait pu expliquer leur mort naturelle avant d'être dévorés par la mère. Il se peut que des malformations passées inaperçues soient à l'origine des morts ou disparitions de 24 heures. Dans la présente expérience, nous n'avons rien remarqué d'anormal chez les ratons morts ou chez les vivants dont plusieurs avaient la poche stomacale pleine de lait; aussi il n'est pas impossible que même si la progéniture est normale, la mère éprouve le besoin de dévorer sa portée pour compenser les déficiences de son régime et la baisse irréversible de ses réserves de vitamine B12.

Les ratons normaux (ayant leur flore microbienne autochtone) ont montré un taux de mortalité minime : 2 morts sur 8 le premier jour pour la seule ratte n° 4 ce qui représente environ 6 p.100 pour l'ensemble des 31 ratons. Cette léthalité peu élevée est tout à fait dans les normes de nos élevages de rats. Par ailleurs la mortalité a été nulle après 24 heures chez les ratons n'ayant pas été sacrifiés pour étude de leurs contenus en cobalamines-B12.

Contenus en cobalamines-B12 chez les rattes et leurs portées -

Nous avons voulu voir quelle serait l'incidence de la gestation et de l'allaitement éventuel sur l'état des réserves en cobalamines-B12. Pour faire un bilan du déficit en vitamine B12 provoqué par la gestation alors qu'il n'y a aucun apport extérieur, nous avons ajouté à nos dosages habituels (contenu des orga-

nes), d' une part, celui de la carcasse de la mère (le mot carcasse comprenant la totalité du rat sauf les organes prélevés pour dosages séparés), d'autre part, ceux de la portée considérée dans sa totalité, et enfin, dans un cas, ceux des organes et carcasse de rats à microflore élevés jusqu'au sevrage.

Contenus et teneurs chez les mères .Le TABLEAU VII indiquait déjà quelle était l'importance des réserves en cobalamines-B12 dans le foie et les reins des rattes des lots A et C après leurs gestations. Nous reprenons ici ces valeurs en les groupant (Foie + Reins) comme s'il s'agissait d'une réserve "mobilisable", sans nous cacher à nous-mêmes combien il y a d'arbitraire dans cette dénomination, nous autorisant simplement du fait que le foie et les reins sont les organes les plus riches en vitamine B12, en valeur absolue et en teneur par g. Nous avons pu voir, en outre, qu'ils subissent des baisses considérables de leur contenu lors du maintien des animaux à un régime totalement carencé en cette vitamine.

Le TABLEAU IX fournit un bilan général des contenus en cobalamines-B12 des rattes sacrifiées après gestation. La comparaison des lots A et C montre qu'en régime carencé les valeurs sont constamment supérieures chez les rattes du lot C. Apparemment, la vitamine B12 de la carcasse semble faire exception si l'on considère son contenu total (2280 μ g pour le lot A contre 1472 μ g pour le lot C). Mais lorsqu'on rapporte ce contenu à l'unité de poids vif les différences s'estompent considérablement; de même les teneurs par gramme sont très voisines dans les deux lots. Il n'en reste pas moins vrai que la gestation, qui affecte nettement les réserves hépatiques et rénales de cyanocobalamine, reste sans effet sur le stock vitaminique de la carcasse. Le maintien de ce "capital" n'empêche pas la forte mortalité néonatale chez les rattes axéniques au régime carencé. C'est peut-être là l'indice que la cyanocobalamine de la carcasse, du moins à ce stade de la carence, n'est pas mobilisable contrairement à la cyanocobalamine des "réserves" foie et reins.

- TABLEAU IX -

Cobalamines et vitamine B12 chez les rattes au régime carencé
après gestation et mise-bas

Moyennes des Cobalamines totales (en $\mu\text{g} \pm \text{Gm}$)

Lots	Contenus totaux		Contenus p.100g de poids corporel		Teneur par g	
	A	C	A	C	A	C
Foie	742 $\pm$ 26	787 $\pm$ 47	230 $\pm$ 11	343 $\pm$ 21	82 $\pm$ 7,2	89 $\pm$ 7,5
Reins	1012 $\pm$ 48	1086 $\pm$ 21	312 $\pm$ 16	474 $\pm$ 12	438 $\pm$ 41	644 $\pm$ 35
Réserve "Foie et Reins"	1754	1873	542	817		
Carcasse	5616 $\pm$ 360	10456 $\pm$ 1091	1738 $\pm$ 126	4598 $\pm$ 584	17,4 $\pm$ 1,3	46 $\pm$ 5,8
Rat entier	7370	12329	2280	5415	23	54
<u>Moyennes de la vitamine B12 (en $\mu\text{g} \pm \text{Gm}$)</u>						
Foie	230 $\pm$ 23	293 $\pm$ 8	71 $\pm$ 7	128 $\pm$ 5	26 $\pm$ 4	33 $\pm$ 1,3
Reins	247 $\pm$ 14	299 $\pm$ 26	77 $\pm$ 5	130 $\pm$ 9	107 $\pm$ 12	177 $\pm$ 16
Réserve "Foie et Reins"	477	592	148	258		
Carcasse	2280 $\pm$ 143	1472 $\pm$ 83	706 $\pm$ 57	640 $\pm$ 28	7 $\pm$ 0,6	6,4 $\pm$ 0,3
Rat entier	2757	2062	854	898	8,5	9,0

- TABLEAU X -

Cobalamines et vitamine B12 chez les Ratons à la naissance

Rattes	Nombre de ratons	Poids de la portée (en g)	Contenu total	Contenu par rat	Teneur par gramme
<u>Cobalamines totales (en µg)</u>					
<u>Lot A</u>					
n°4	8	48,4	1630	204	33,7
5	9	45,4	1730	192	38,1
<u>Lot C</u>					
n°2	9	71,2	1840	204	25,8
3	8	48,9	1620	202	33,1
4	8	47,1	1840	230	39,1
<u>Vitamine B12 (en µg)</u>					
<u>Lot A</u>					
n°4	8	48,4	780	97	16,1
5	9	45,4	650	72	14,3
<u>Lot C</u>					
n°2	9	71,2	730	81	10,3
3	8	48,9	720	90	14,7
4	8	47,1	520	65	11,0

- TABLEAU IX -

Cobalamines et vitamine B12 chez les Rattes au régime carencé
après gestation et mise-bas

En effet, on trouve dans les foies et les reins des différences très accusées au profit du lot C pour ce qui est des teneurs par gramme d'organe et surtout pour les contenus par unité de poids corporel. Les "réserves" de l'ensemble "Foie + Reins" sont de 50p.100 plus élevées pour les cobalamines et de 75 p.100 pour la vitamine B12 chez les rattes possédant leur flore microbienne normale. Or, nous avons déjà signalé que ces dernières assuraient une mise-bas normale sans possibilité de récupération de la vitamine B12 prélevée par leur portée, contrairement aux rattes axéniques qui avortaient ou mangeaient leurs petits.

Contenus et teneurs chez les ratons à la naissance. Le prélèvement de vitamine effectué par la portée n'est pas négligeable. D'après le TABLEAU X il est du même ordre de grandeur pour les portées axéniques (lot A) et normales (lot C). Le contenu en cobalamines totales correspond à peu près à la somme des réserves "Foie + Reins" des lots A et C des mères (TABLEAU IX); il représente 23 p. 100 du contenu total moyen de la ratte axénique mais seulement 14 p. 100 de ce même contenu chez la Ratte à flore microbienne.

- TABLEAU X -

Cobalamines et vitamine B12 chez les Ratons à la naissance

Si nous considérons la vitamine B12 il ressort de la comparaison des TABLEAUX IX et X que le contenu des portées du lot C (657 mp μ g en moyenne) équivaut à 110 p.100 des réserves "Foie + Reins" des mères tandis que dans le lot A les portées représentent en moyenne 715 mp μ g soit 150 p.100 de la valeur des contenus moyens "Foie + Reins" de la mère axénique. La quantité totale prélevée par une portée à la naissance est du même ordre de grandeur pour les lots axéniques et normaux et correspond à 30 p.100 environ du contenu total moyen de la mère. On voit combien grand est le déficit en vi-

vitamine B12 dû à la formation des ratons jusqu'à la naissance. Or, ce n'est là qu'un bilan en quelque sorte statique du prélèvement de vitamine par la portée sur les réserves de la mère : nous ne tenons pas compte des dépenses de développement avant la naissance qui doivent comporter une certaine quantité de vitamine métabolisée et détruite.

- FIGURE 6 -

Prélèvement des portées sur les réserves des mères

Dans la FIGURE 6 nous avons représenté les contenus totaux en cobalamines-B12 des mères et de leurs portées correspondantes. L'importance de la dépense en vitamine B12 nécessitée par la gestation d'une portée de 8-9 ratons est évidente par rapport aux réserves dont peut disposer la mère. La possibilité pour les mères normales de puiser dans les réserves en vitamine du contenu digestif ou des fèces explique bien la réussite de leurs gestations et mise-bas. Il n'en est pas de même pour les rattes axéniques et l'on conçoit que leurs gestations aboutissent à un taux élevé de mortalité dès le premier jour et à l'impossibilité de survie du reste de la portée les jours suivants .

Quantité et répartition chez les ratons au sevrage . La même figure 6 et le tableau XI nous montrent les quantités de cobalamines et de vitamine B12 accumulées par une portée de 5 ratons du Lot C durant l'allaitement jusqu'au sevrage. Les cobalamines totales

- TABLEAU XI -

Quantité et répartition des cobalamines-B12 chez une portée de 5 ratons au sevrage

de l'ensemble de la portée sont sensiblement égales au contenu total moyen des mères. Quant à la vitamine B12 contenue dans les 5 ratons sacrifiés au sevrage elle n'est inférieure que de 10 p.100 environ à la totalité de la vitamine B12 se trouvant dans le corps de la mère. Si une portée de ratons à la naissance représente en vitamine B12 le tiers environ du contenu de la mère et un peu plus que

Contenus totaux en :

Cobalamines Vitamine B₁₂

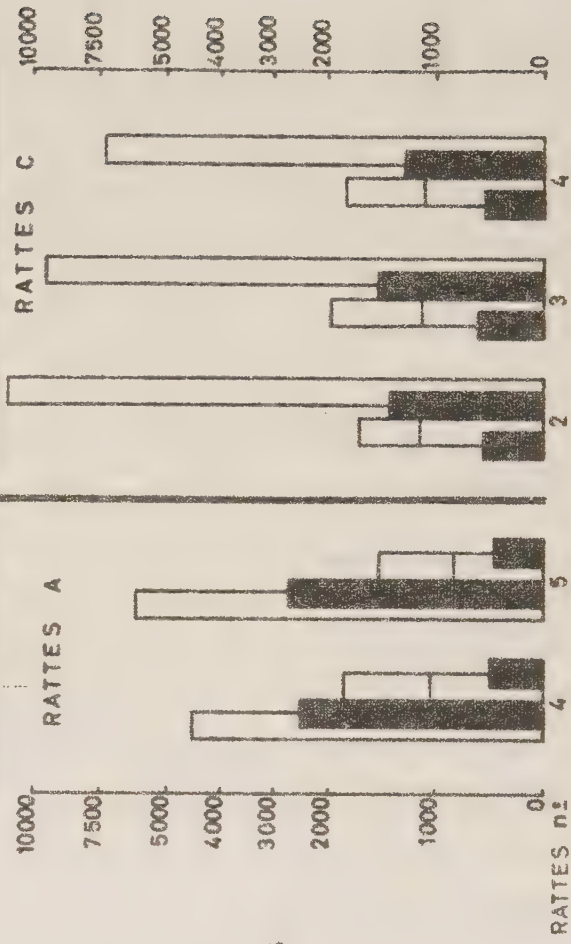
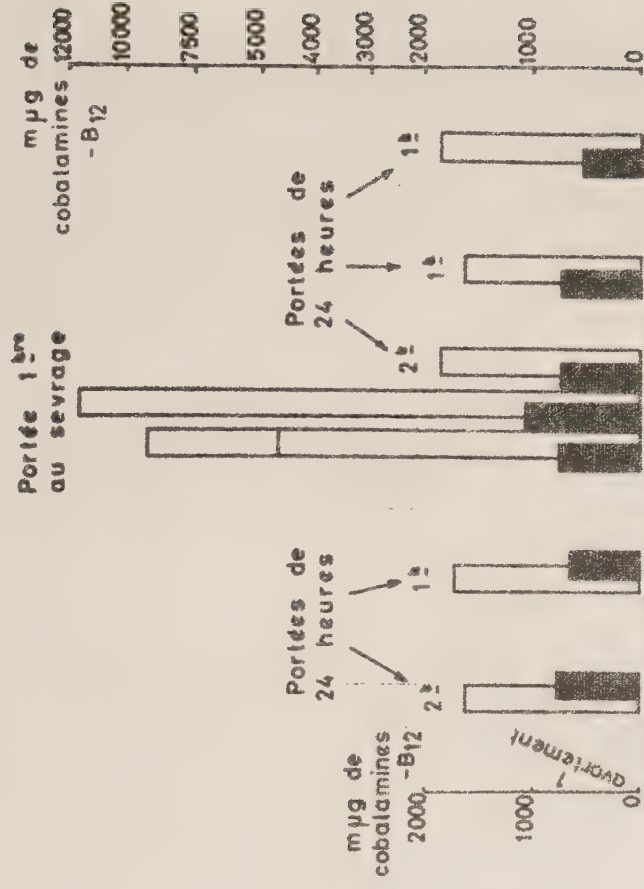
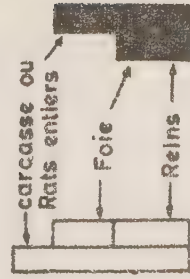


Figure 6

PRÉLÈVEMENT
DES PORTÉES
SUR LES RÉSERVES
DES MÈRES

- TABLEAU XI -

Quantité et répartition des cobalamines - B12 chez une portée
de 5 Ratons au sevrage
 (Lot C: Ratte n°2)

	Poids de la portée(en g)	Contenus Totaux	Contenus par rat	Teneur par gramme
	<u>Cobalamines totales (en µg)</u>			
Foie	18,7	896	180	48
Reins	3,5	936	188	267
"Réserve" Foie + Reins		1832	368	
Carcasse	201,7	11640	2328	57,7
Portée entière	223,9	13472	2696	
Rat entier				60,1
	<u>Vitamine B12 (en µg)</u>			
Foie	18,7	352	70	18,8
Reins	3,5	404	81	115,4
"Réserve" Foie + Reins		756	151	
Carcasse	201,7	1080	216	5,4
Portée entière	223,9	1836		8,2
Rat entier			367	

des réserves des organes les plus riches, en ajoutant l'allaitement c'est au moins l'équivalent de toute sa vitamine B12 corporelle que la mère est obligée de fournir. En fait ces valeurs doivent être majorées des pertes en vitamine B12 métabolisée et détruite au cours de ces mêmes périodes. On conçoit donc qu'avec le régime totalement carencé et en l'absence de tout autre apport il est impossible à la ratte axénique de prélever pour sa portée toute sa réserve en vitamine B12. Cette atteinte exclusive de la progéniture pourrait paraître paradoxale sans étude des réserves que doit accumuler le jeune rat puisque à partir du sevrage le régime carencé n'affecte pas les fonctions vitales et ne donne lieu pour la mère à aucun signe apparent de carence.

III - EFFETS DE LA CARENCE B12 CHEZ LES RATS NORMAUX DE =====

PLUSIEURS GENERATIONS -

=====

Les reproductions de rats possédant une microflore intestinale normale d'origine s'étant faites dans des bonnes conditions, ainsi que l'allaitement, malgré le régime totalement carencé en vitamine B12, nous avons pu étudier les effets de ce régime sur plusieurs générations de deux lignées appelées CX et CY. Les ratons à microflore complète provenant de la Ratte C n° 5, qui ont été les seuls à ne pas être sacrifiés en bas âge, représentent la deuxième génération de la lignée CX (Rats CX-2). Les femelles de cette deuxième génération accouplées avec des rats mâles non carencés sont à l'origine des générations successives pour lesquelles les accouplements ont été faits par croisement entre rats au régime carencé. Ces rats de générations successives ont été désignées de façon analogue jusqu'à la 6ème génération (CX-6).

D'autres ratons élevés exactement dans les mêmes conditions, représentent la lignée CY pour laquelle nous nous sommes limités à l'étude de trois générations (Rats CY-1 à CY-3). Enfin une autre lignée, CZ, n'a fait l'objet que d'une étude interrompue à la deuxième génération. La possibilité pour les rats à microflore intesti-

nale de compenser en grande partie les déficiences du régime alimentaire rendaient sans intérêt l'étude du régime subcarencé. Nous n'avons donc expérimenté que le régime totalement carencé à base de farine de soja.

A)- ETUDE DU RAT EN CROISSANCE -

Protocole expérimental - Il était difficile de composer des lots de même importance et de les suivre de façon parallèle alors que les gestations des différentes ratte ne coïncidaient pas. Nous comparons donc la croissance des lots de même âge élevés à des époques différentes. Pour les diverses déterminations nous avons simplement noté l'âge des rats au moment du sacrifice lequel dépendant de multiples impératifs dont la nécessité de garder une limite au nombre de rats en élevage, n'a pu être fait à la même période de croissance. Ceci nous a permis en particulier d'évaluer l'état des réserves pour un large éventail de rats d'âges divers et de portées différentes.

Contrôle des effets du régime en cours d'expérience -

Croissance pondérale . Les moyennes des poids des différentes générations des deux lignées sont représentées par les courbes de croissance de la FIGURE 7 pour les rats mâles et de la FIGURE 8 pour les rats femelles. En ce qui concerne ces dernières les pesées ont été interrompues au moment où les gestations amenaient des accélérations individuelles importantes dans la prise de poids. Il en est de même pour les TABLEAUX XII et XIII qui montrent les gains de poids moyens de ces mêmes rats mâles et femelles suivis des différences de ces gains de poids entre les générations successives et la première. En outre , sans faire état de tous les poids suivant l'âge des rats des différentes générations que l'on peut aisément déduire de leurs courbes de croissance nous rapportons les écarts de poids moyens à partir de la 2ème génération par rapport à la première.

CROISSANCE MOYENNE DES RATS σ NORMAUX DE PLUSIEURS GÉNÉRATIONS
AU RÉGIME TOTALEMENT CARENCÉ EN VITAMINE B₁₂

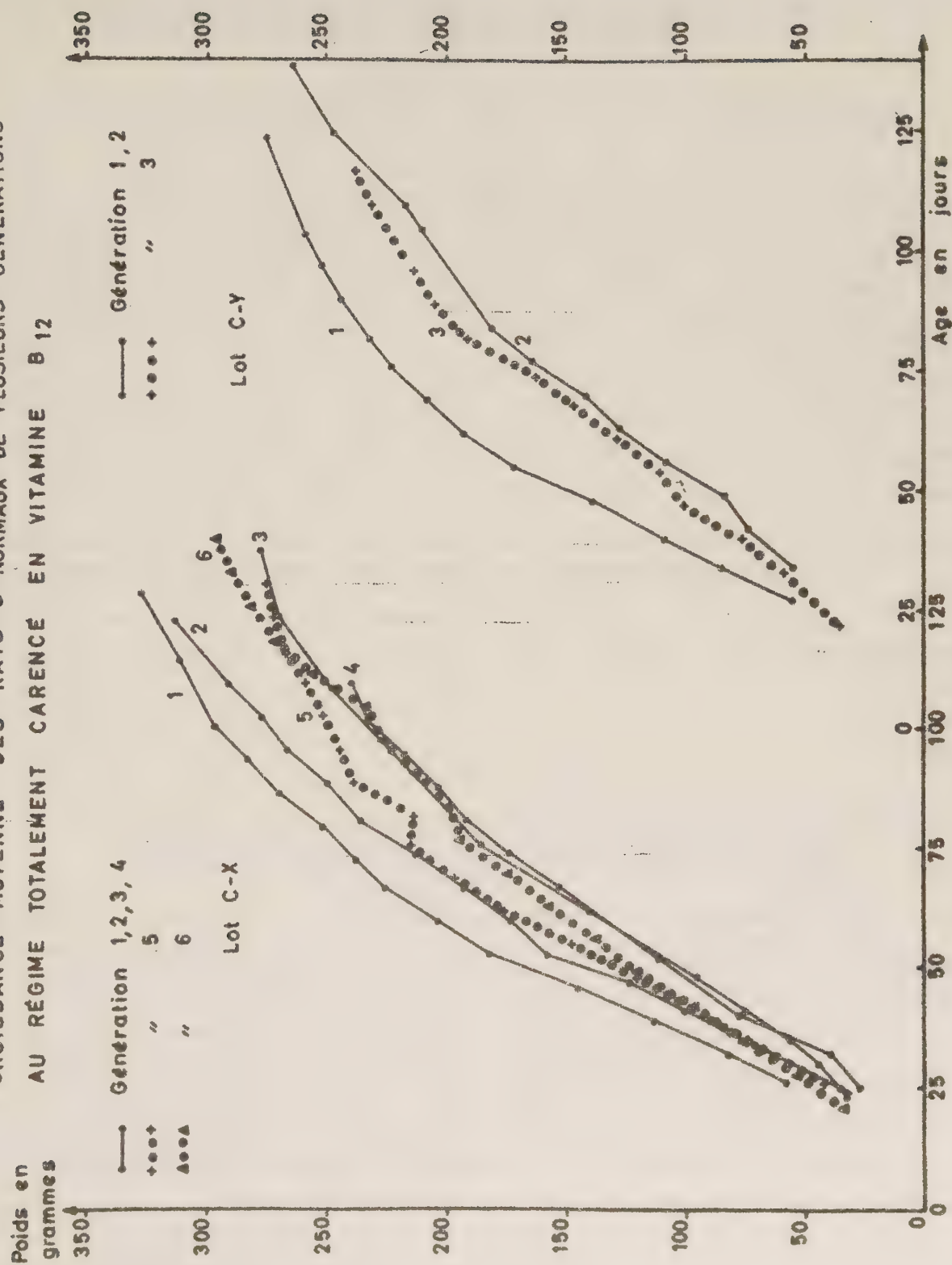


Figure 7

- - TABLEAU XII - -

Gains de poids moyens en g par jour des Rats mâles
normaux au régime carencé

	Générations								
	CX-1	CX-2	CX-3	CX-4	CX-5	CX-6	CY-1	CY-2	CY-3
Nombre de rats	(7)	(4)	(8)	(7)	(5)	(6)	(10)	(3)	(8)
<u>Période</u>									
4ème semaine	4,2	4,0	2,0	1,7	3,6	2,7	4,3	1,9	2,2
2ème mois	4,4	3,9	3,0	3,3	3,8	3,0	4,1	2,2	2,4
3ème -	2,4	2,7	3,2	2,4	2,3	2,0	2,0	2,6	2,7
4ème -	1,5	1,9	1,7	1,7	1,0	2,0	0,9	1,6	1,2
<u>Différences de gains de poids par rapport à la première</u>									
	<u>génération</u>								
4ème semaine	-	-0,2	-2,2	-2,5	-0,6	-1,5	-	-2,4	-2,1
2ème mois	-	-0,5	-1,4	-1,1	-0,6	-1,4	-	-1,9	-1,7
3ème -	-	+0,3	+0,8	0	-0,1	-0,4	-	+0,6	+0,7
4ème -	-	+0,4	+0,2	+0,2	-0,5	+0,5	-	+0,7	+0,3
<u>Ecart de poids moyen par rapport à la première</u>									
		<u>génération</u>							
Age	Poids en g	Diminution en %					Poids en g	Diminution en %	
1 mois	73	-25	-40	-52	-23	-19	69	-35	-25
2 -	204	-15	-34	-34	-18	-27	187	-36	-33
3 -	276	- 8	-23	-25	-13	-23	244	-22	-15
4 -	317	- 3	-17	-21	-15	-14	272	-13	-11

- FIGURE 7 -

Croissance moyenne des rats mâles normaux de plusieurs générations
au régime totalement carencé en vitamine B12

- TABLEAU XII -

Gains de poids moyens en g. par jour des Rats mâles normaux
au régime carencé

L'observation de la FIGURE 7 montre que chez les rats mâles la croissance se ralentit avec la prolongation de la carence et cela jusqu'à la 4ème génération de la lignée CX. Par contre les générations 5 et 6 manifestent une tendance à augmenter leur gain moyen de poids : les courbes de croissance, sans atteindre la courbe de la 1ère génération, s'inscrivent nettement au-dessus des courbes de la 3ème et la 4ème génération. Certains individus de la génération 5 maintenus au même régime pendant plus d'un an présentaient au bout de ce temps des poids similaires à ceux des rats adultes au régime normal. En ce qui concerne la lignée CY la génération 3 montre également des poids toujours supérieurs en moyenne à ceux de la génération 2. La généralité de ce phénomène : poids toujours inférieur des générations successives par rapport à la première, qui est elle-même au régime carencé mais dont les réserves au sevrage étaient normales, montre l'effet de la carence alimentaire de vitamine B12 chez le rat normal. Cependant cette tendance ne s'accroît pas au cours des générations successives. Comme le montre la partie inférieure du TABLEAU XII, pour les deux lignées étudiées les écarts atteignent le maximum pour les générations CX-4 et CY-2. Pour chaque génération nous voyons, en outre, que les différences les plus grandes par rapport au poids de la 1ère génération se situent au premier ou au deuxième mois; ces différences s'estompent progressivement en pourcentage au fur et à mesure que les rats grandissent contrairement à l'apparente divergence des courbes de croissance.

Les constatations faites à propos des rats mâles se répètent pour les femelles (FIGURE 8 et TABLEAU XIII) à ceci près que les courbes de croissance les plus basses correspondent aux générations CX -3 et CY - 3 tandis que les poids des rats des généra-

tions CX-6 et surtout CX-5 tendent à devenir beaucoup plus forts. Le minimum des gains de poids et les écarts maximum de poids total pour chaque génération par rapport à la première s'observent, ici aussi, au cours du premier mois ou du second.

- FIGURE 8 -

Croissance moyenne des rats femelles normaux de plusieurs générations au régime totalement carencé en vitamine B12

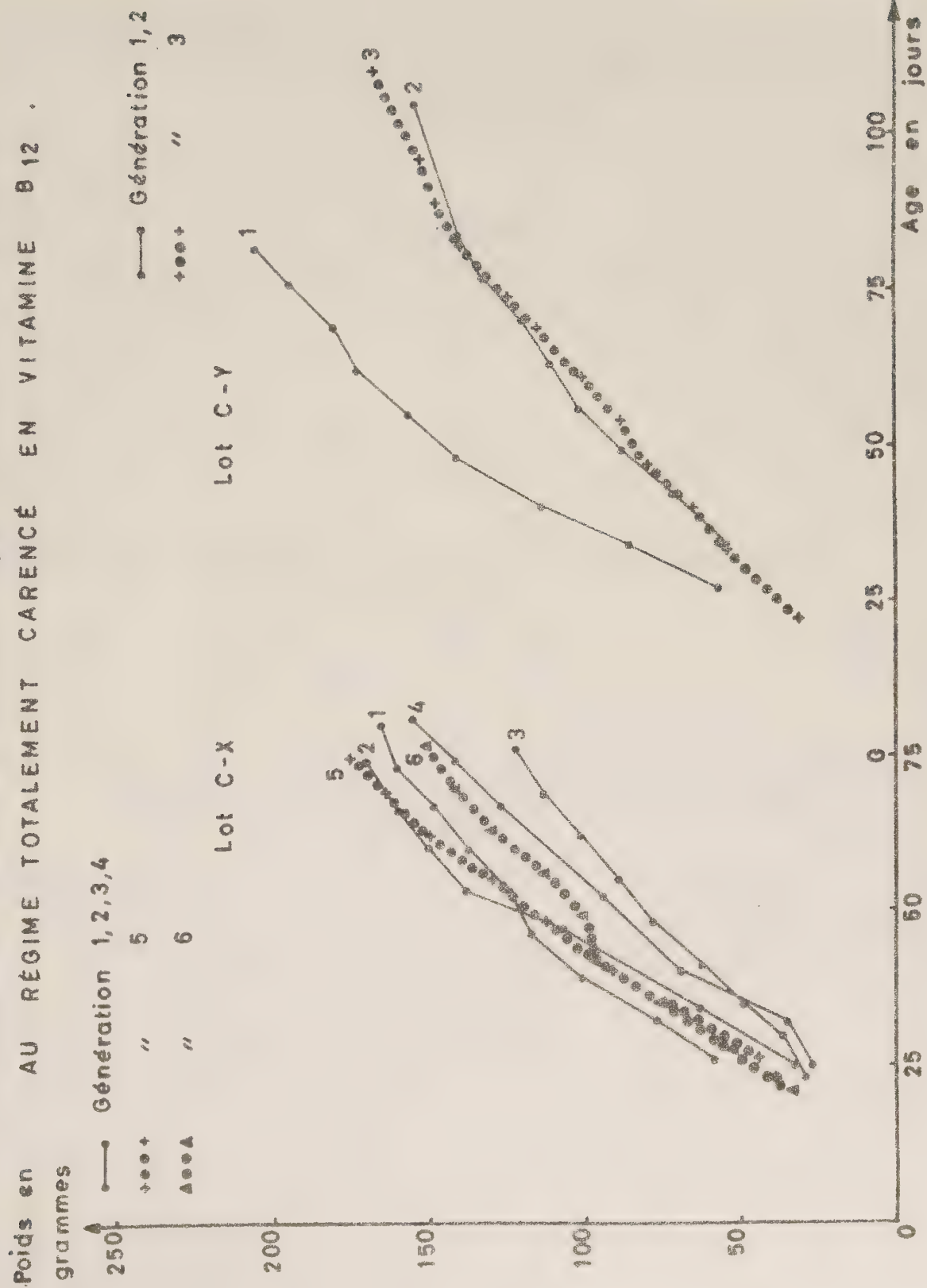
- TABLEAU XIII -

Gains de poids moyens par jour des rats femelles normaux au régime carencé

Que faut-il en conclure ? Sur le plan des générations successives l'incidence de la carence sur le poids atteint une certaine limite après quoi elle s'atténue et on assiste à une sorte d'adaptation des rats à leur régime. Bien entendu, nous raisonnons sur des moyennes ; or, dans chaque lot on trouve des croissances individuelles très déficientes à côté de croissances normales ou presque.

Au sein d'une même génération on peut aboutir à une conclusion de portée encore plus générale. Elle concerne l'âge : les différences par rapport à la première génération sont les plus importantes au moment du sevrage ou entre cette date et le 2ème mois ; ces différences tendent à s'estomper vers le 3ème et le 4ème mois. A notre avis ce phénomène tient à deux causes. D'une part le besoin en vitamine B12 est maximum au premier âge : à ce stade le régime carencé atteint le développement du raton, la mère étant prioritaire pour ce qui est de la satisfaction du besoin en vitamine B12. Le retard de croissance ne se comblera que progressivement lorsque le besoin diminue à mesure qu'on atteint l'âge adulte. D'autre part la raton ne peut guère bénéficier des synthèses intestinales. Dans sa flore, relativement simple, les lactobacilles prédominent. Ce n'est qu'après le sevrage que la flore se diversifie et comporte un nombre important d'anaérobies stricts producteurs de cobalamines. Même si ces synthèses existaient il semble fort douteux que le raton élevé au sein maternel se livre à la coprophagie.

CROISSANCE MOYENNE DES RATS ♀ NORMAUX DE PLUSIEURS GÉNÉRATIONS
AU RÉGIME TOTALEMENT CARENCÉ EN VITAMINE B₁₂.



五五五

- TABLEAU XIII -

Gains de poids moyens par jour des rats femelles
normaux au régime carencé
(en grammes)

	Générations								
	CX-1	CX-2	CX-3	CX-4	CX-5	CX-6	CY-1	CY-2	CY-3
Nombre de rats	(5)	(3)	(10)	(7)	(9)	(8)	(5)	(5)	(10)
<u>Période</u>									
4ème semaine	3,2	3,4	1,2	1,1	3,3	2,7	4,1	2,0	2,1
2ème mois	2,1	3,3	2,1	2,6	2,8	2,2	3,4	2,0	1,8
3ème -	1,6	1,7	1,6	2,6	2,0	1,4	2,1	1,4	1,7
<u>Différences de gains de poids par rapport à la première</u>									
	<u>génération</u>								
4ème semaine	-	+0,2	-2,0	-2,1	+0,1	-0,5	-	-2,1	-2,0
2ème mois	-	+1,2	0	+0,5	+0,7	+0,1	-	-1,4	-1,6
3ème -	-	+0,1	0	+1,0	+0,4	-0,2	-	-0,7	-0,4
<u>Ecart de poids moyen par rapport à la première</u>									
	<u>génération</u>								
Age	Poids en g	Variations en %					Poids en g	Variations en %	
1 mois	70	-30	-49	-54	-19	-14	68	-34	-31
2 -	137	+10	-29	-19	+5	-11	168	-37	-42
3 -	161	+7	-25	-11	+9	-8	202	-33	-33

- TABLEAU XIV -

Elimination fécale moyenne des cobalamines chez les rats normaux
de plusieurs générations

Cobalamines totales en μg /rat/24 heures

(Teneurs par g de fèces frais)*

RATS	Fin du 1er mois	2ème mois	3ème mois	4ème mois	5ème mois	6ème mois
IS-1 ♂	420 (420)	990 (730)	1830 (780)	2040 (690)	2550 (1080)	4300 (1540)
IX-1 ♂	1620 (1015)	2930 (1340)	3840 (1160)	5980 (3930)	4600 (990)	
♀		2710 (1040)				
(*) ♂ et ♀				6920 (2223)	5820 (1570)	7600 (1840)
IX-2 ♂		4530 (2200)	5930 (1470)	5300 (1220)		
♀		3650 (1540)	4650 (1460)			
IX-3 ♂				5200 (1822)	4050 (427)	5700 (766)
♀				5200 (2350)	5070 (583)	4900 (1260)
(**) ♂ et ♀						7360 (2116)
XY-1 ♂		2806 (745)	5277 (1022)	5913 (1120)		
♀		5006 (1420)	6562 (1655)			
XY-2 ♂				5117 (700)		4994 (705)
♀				1832 (352)		3151 (837)
(**) ♂ et ♀						5644 (1099)

(*) Nous donnons entre parenthèses les teneurs en cobalamines par g de fèces frais bien que la teneur en eau de ceux-ci puisse varier sensiblement

(**) Rats en accouplement

Elimination fécale moyenne de la vitamine B12 chez les rats
normaux de plusieurs générations
Vitamine B12 en mg/24 heures
(Teneurs par g de fèces frais)*

RATS	Fin du 1er mois	2ème mois	3ème mois	4ème mois	5ème mois	6ème mois
CS-1 ♂	230 (230)	150 (120)	140 (330)	120 (170)	165 (70)	160 (50)
CX-1 ♂	150 595)	240 (80)	130 (40)	180 (110)	470 (100)	
♀		230 (120)				
(**) ♂ et ♀				195 (63)	2720 (730)	5840 (1410)
CX-2 ♂		180 (90)	350 (110)	445 (100)		
♀		113 (50)	314 (90)			
CX-3 ♂				160 (80)	175 (40)	190 (30)
♀				150 (70)	230 (50)	180 (50)
(**) ♂ et ♀						255 (77)
CY-1 ♂		210 (60)	100 (20)	310 (60)		
♀		140 (40)	160 (45)			
CY-2 ♂				120 (20)		130 (20)
♀				50 (10)		95 (25)
(**) ♂ et ♀						160 (33)

(*) Nous donnons entre parenthèses les teneurs en vitamine B12 par g de fèces frais bien que la teneur en eau de ceux-ci puisse varier sensiblement

(**) Rats en accouplement

Elimination fécale - Dans les TABLEAUX XIV et XV nous avons noté les valeurs d'élimination des lignées CX et CY et, pour comparaison, nous y avons joint celles concernant la première expérience au régime subcarencé (Lot CS). L'élimination fécale moyenne par 24 heures des cobalamines totales et de la vitamine B12 traduit des synthèses assez variables au niveau du tube digestif. Cependant on peut constater une tendance à l'augmentation des cobalamines éliminées avec l'âge (TABLEAU XIV). Cette augmentation peut s'expliquer par l'accroissement en volume des organes de l'animal. Elle témoigne aussi d'une plus grande concentration de cobalamines par g de fèces fraîches dont les teneurs varient du simple au triple en augmentant avec l'âge. Cette observation suggère que la nature de la flore intestinale et sa capacité de synthèse évolue dans le temps. Nous remarquerons aussi, bien que les déterminations faites ne soient pas assez nombreuses, que les éliminations de cobalamines des rats mâles et femelles maintenus ensemble en accouplement sont supérieures à celles des rats mâles ou femelles en dehors de cette période. La même remarque peut être faite en comparant les teneurs par g de fèces fraîches des rats en accouplement ou non.

- TABLEAU XIV -

Elimination fécale moyenne des cobalamines chez les rats normaux de plusieurs générations

- TABLEAU XV -

Elimination fécale moyenne de la vitamine B12 chez les rats normaux de plusieurs générations

En ce qui concerne la vitamine B12, nous ne pouvons faire état du même accroissement avec l'âge bien qu'il soit visible chez certains rats (TABLEAU XV, Lot CX-2). Le plus souvent, d'ailleurs, le taux de vitamine B12 par rapport aux cobalamines totales ne représente qu'une valeur assez faible variant entre 3 et 10 p.100. Par contre, chez les rats en accouplement les valeurs de vitamine B12 des fèces sont souvent plus élevées que chez les rats mâles ou femelles séparés (tant sur l'élimination par 24 heures que sur les

teneurs par g) et, par exemple, chez le lot CX-1, peuvent atteindre au 5ème et 6ème mois jusqu'à 50 et 75 p.100 des cobalamines totales

Signes hématologiques .

Numérations globulaires. Au cours de ce travail nous avons été amenés à changer le mode de prélèvement du sang, nous trouvant en présence de sujets très amaigris (faisant partie d'ailleurs des lots axéniques) qui présentaient un collapsus des vaisseaux périphériques ne permettant pas d'obtenir à la queue les quantités de sang désirées. Nous avons alors pratiqué systématiquement la ponction cardiaque au moment du sacrifice. C'est pourquoi les données que nous rapportons concernent d'abord le sang périphérique puis le "sang central" prélevé à la seringue directement au niveau du ventricule gauche. Il est connu que le nombre d'hématies par mm³ est plus élevé dans le sang périphérique : nous-mêmes, après prises de sang successives chez le même rat à la queue puis au coeur, avons trouvé des différences en général supérieures à un million d'hématies par mm³, la numération la plus forte étant celle du sang périphérique. Quelle qu'en soit la raison (sans doute un ralentissement de la circulation avec plus ou moins grande accumulation des hématies dans les artérioles terminales) nous tenons compte de ces différences dans l'appréciation des résultats.

La plupart des données correspondent à des numérations faites au moment du sacrifice. Ce dernier ayant eu lieu à des âges variables suivant les besoins de l'expérimentation, nous avons une distribution assez large et non systématique des valeurs pour divers âges de rats de différentes générations (chaque lot porte un nombre de 1 à 6 qui indique la génération de chaque lignée CX et CY depuis le début de la carence B12).

On présente dans les TABLEAUX XVI et XVII, respectivement pour les rats mâles et femelles, les valeurs trouvées au cours des numérations globulaires. Etant donné qu'elles ne résultent pas d'expériences systématiques destinées à connaître le nombre d'hématies suivant l'âge des rats et leur génération et qu'elles concernent des

- TABLEAU XVI -

Numération globulaire moyenne des rats mâles normaux de plusieurs
générations au régime carencé

Hématies en millions par mm³

(nombre de rats du lot)*

Lots de rats et généra- tions	Age en mois						
	1	2	3	4	5	6	13
	(sang périphérique)						
CX-1						9,22 (7)	
CX-2				7,93 (4)			
CX-3				8,98 (4)	8,35 (1)		
CX-4	6,44 (3)		8,40 (2)	9,92 (3)			
CX-5				8,68 (1)	9,39 (2)	9,91 (2)	
CX-6		8,12 (2)					
CY-3			9,07 (2)				
Contrôles	7,36 (1)						
	(sang central)						
CX-5						7,73 (2)	10,45 (2)
CX-6						8,64 (6)	
Contrôles		8,47 (7)	8,44 (2)				

(*) Nous donnons entre parenthèses le nombre de rats du lot

- TABLEAU XVII -

Numération globulaire moyenne des rats femelles de plusieurs
générations au régime carencé
Hépaties en millions par mm³
 (nombre de rats du lot) *

Lots de rattes et géné- rations	Age en mois										
	1	2	3	4	5	6	7	9	12	13	
	(<u>sang périphérique</u>)										
CX-1					9,16 (5)						
CX-2				8,45 (3)							
CX-3				7,65 (1)	8,24 (3)		8,15 (2)				
CX-4			8,78 (1)				7,35** (1)				
CX-5				9,17 (3)	8,25 (2)	8,75 (2)					
CX-6		7,09 (2)									
CY-2									10,44 (3)		
CY-3			8,50 (3)	9,85 (3)		9,27 (4)	9,05 (4)				
Contrôles	6,98 (1)										
	(<u>sang central</u>)										
CX-5										8,48 (2)	
CX-6					8,00 (4)		8,58 (4)				
Contrôles	8,94 (4)	8,80 (5)									

(*) Nous donnons entre parenthèses le nombre de rats du lot
 (**) Femelle en gestation de 15 jours environ

rats sacrifiés en nombre divers, ces données fragmentaires ne permettent aucune conclusion formelle. Tout au plus peut-on trouver une tendance à l'augmentation du nombre d'hématies avec l'âge par rapport aux premiers mois. Quelques déterminations de contrôle chez des rats normaux du stock soumis à un régime industriel n'avaient pour but que d'apprécier si les valeurs chez les rats soumis à la carence étaient du même ordre de grandeur que chez les rats élevés normalement. Or, c'est effectivement le cas.

- TABLEAU XVI -

Numération globulaire moyenne des rats mâles normaux de plusieurs générations au régime carencé

- TABLEAU XVII -

Numération globulaire moyenne des rats femelles normaux de plusieurs générations au régime carencé

L'ensemble des données obtenues même si elles ne résultent pas d'analyses comparées systématiquement est suffisamment probant pour pouvoir affirmer que nous ne trouvons aucun signe d'anémie dans le lot C (une valeur légèrement faible chez une femelle au 6ème mois de gestation doit avoir une cause physiologique): On peut affirmer aussi que d'une génération sur l'autre, alors que le régime continue à être totalement carencé en vitamine B12, on n'observe la moindre tendance évolutive vers l'anémie carencielle.

Dans les tableaux précités nous ne rapportons que des moyennes mais nous pouvons tirer de l'analyse des données individuelles l'exemple de certains rats amaigris qui présentent une nette tendance à la polyglobulie, notamment chez les femelles CY-2, âgées d'un an (TABLEAU XVII) dont le poids moyen est inférieur à 200 g et pour deux d'entre elles à 170 g.

Hématocrites . L'étude de l'hématocrite n'accompagnait que les analyses faites sur le sang central aussi les données dont nous disposons sont peu nombreuses. La valeur s'établit chez les mâles autour de 53-54 p.100, chez les femelles autour de 50-51 p.100

Comme le nombre d'hématies est presque toujours légèrement supérieur chez les rats mâles le volume globulaire moyen calculé prend sensiblement la même valeur : $62 \mu^3$ (microns-cubes) pour les mâles, $61 \mu^3$ pour les femelles. Mais ce sont là des moyennes et comme les valeurs individuelles de l'hématocrite varient très peu, les volumes globulaires moyens calculés subissent les répercussions du nombre d'hématies par mm³. C'est ainsi qu'à certaines polyglobulies (lot CY-5), 13 mois, du TABLEAU XVI) correspondent des volumes globulaires bas, soit une tendance à la microcytose.

Frottis sanguins. Nous avons effectué un certain nombre de frottis sanguins, en particulier chez les rats maintenus en régime carencé depuis plusieurs générations. En aucun cas nous n'avons pu constater la présence des cellules caractéristiques de l'anémie de BIERMER (mégalo blastes, mégalo cytes et macrocytes). Par contre nous avons rencontré à plusieurs reprises et en assez grande proportion des érythrocytes ou hématies nucléées de taille normale. Il nous est impossible de dire si ce fait peut être rattaché aux particularités du régime alimentaire puisque, par ailleurs, la présence d'érythrocytes n'est pas inhabituelle chez le rat normal non anémié.

Pour ce qui est de la lignée blanche nous n'avons pas non plus retrouvé les gros noyaux hypersegmentés de macroleucocytes qui ont été signalés dans la carence B12 chez l'homme.

Contenus intestinaux et réserves en cobalamines et vitamine B12.

Contenus de l'intestin grêle et du caecum . Lors des sacrifices de rats normaux, nous avons à plusieurs reprises prélevé les contenus de l'intestin grêle et de l'estomac en vue de la détermination des cobalamines et de la vitamine B12. Les valeurs trouvées aussi bien pour l'estomac que pour l'intestin grêle représentent environ 4 p.100 de celles des contenus caecaux, soit de 100 à 300 μg pour les cobalamines totales et de 20 à 50 μg pour la cyanocobalamine. Cette proportion est assez constante, aussi nous attacherons nous plutôt à l'analyse des contenus du caecum qui par leur impor-

tance quantitative et leurs variations éventuelles risquent de retentir davantage sur la physiologie de l'animal . Notons, cependant, que des doses de 20-50 mg de vitamine B12 peuvent représenter, si elles sont absorbées en totalité par la muqueuse intestinale, de quoi subvenir au besoin quotidien de l'animal.

- TABLEAU XVIII -

Valeurs extrêmes et moyennes des contenus du caecum de Rat normal au régime totalement carencé en vitamine B12

Bien entendu, le caecum représente une réserve bien plus importante et pour nous en tenir à la seule vitamine B12, des quantités de 200 à 1000 mg, même s'il y a utilisation in situ par la flore intestinale, sont beaucoup plus à même d'assurer la couverture du besoin. .

Le TABLEAU XVIII résume les valeurs des contenus caecaux des rats mâles et femelles au régime totalement carencé en vitamine B12 (*). Nous avons ajouté aux moyennes les valeurs extrêmes des analyses pour les différents caecums de chaque lot pour mieux faire ressortir la singularité des résultats pour trois rattes (une du lot CX-4 et deux du lot CY-2) se trouvant en état de gestation ou d'allaitement. Les quantités de cobalamines totales et de vitamine B12 de ces rattes en fonction de reproduction surclassent non seulement les moyennes mais aussi les valeurs extrêmes supérieures de leurs congénères (**). Nous ne manquons pas de rapprocher ce fait des éliminations fécales supérieures, aussi bien en cobalamines totales qu'en vitamine B12 constatées chez les rats et rattes en accouplement. On peut conclure que, chez la femelle, la gestation par sa prise de nourriture très augmentée s'accompagnant d'un métabolisme intensifié au niveau de la lumière intestinale doit aboutir aussi à une prolifération de la microflore; il paraît naturel que les synthèses de cobalamines-B12 en soient favorisées . Si ce processus est général et si la mère peut récupérer ce surcroît de vita-

(*)- La plupart de ces valeurs moyennes (concernant les rats de la lignée CX) avaient déjà été rapportées au cours de la première partie de ce travail afin de les comparer aux dénombrements des principaux genres bactériens se trouvant dans ces caecums.

(**)- Des expériences ultérieures ont pleinement confirmé ce doublement ou triplement des synthèses caecales chez la ratte en allaitement.

mines B12 synthétisées par la flore qu'elle abrite cela ne peut que l'aider à supporter l'épreuve du déficit considérable en vitamine B12 provoquée par les besoins de la progéniture.

En dehors de ce cas caractéristique du cycle de reproduction nous n'avons pu mettre en évidence d'autres variations des cobalamines-B12 du contenu intestinal en rapport avec le sexe, l'âge des rats ou le nombre de générations subissant la carence.

Contenus des reins et du foie . Nous commencerons par donner une vue d'ensemble des variations des réserves chez les rats carencés par rapport aux rats de contrôle (*). Comme toujours les contenus totaux des reins excèdent ceux du foie aussi bien chez les rats de contrôle que chez les rats carencés (TABLEAU XIX).

- TABLEAU XIX -

Variations des réserves (contenus totaux) en vitamine B12 et en cobalamines totales des reins et du foie des rats normaux de lignées au régime carencé

Les pourcentages par rapport à l'ensemble "Reins + Foie" indiquent l'importance relative de la réserve de chacun des deux organes : on voit que pour la vitamine B12 les réserves des reins restent considérables même si l'effet du régime carencé se traduit par une diminution de l'ordre de 90 p.100. On ne saurait trop le répéter : les reins sont le lieu de réserve privilégié de la vitamine B12 proprement dite chez le rat. Si cette vitamine s'y accumule de préférence elle est aussi beaucoup plus facilement mobilisable que dans le foie. En effet, aussi bien chez les rats mâles que chez les femelles la réduction se fait sentir davantage sur les reins que sur le foie. Bien que la différence de variation soit de faible ampleur (7 à 5 p.100), cela suffit cependant pour que nous ayons en moyenne chez les rats carencés seulement deux fois plus de vitamine B12 dans les reins que dans le foie alors que normalement les reins en contiennent plus de 3 fois.

Nous parvenons à des conclusions analogues pour les cobalamines totales bien que la priorité de mobilisation soit moins mar-

(*)- Il s'agit de rats de même race au régime industriel avec vitamine B12 non élevés, dans des conditions strictement parallèles aux lots en expérience,

- TABLEAU XVIII -

Valeurs extrêmes et moyennes des contenus du caecum de Rat
normal au régime totalement carencé en vitamine B12
(en mg)

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			Valeurs		Valeurs	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X-1	7	6	1940-4740	2982	300-1430	569
C-X-3	4	4	1224-6088	3324	85-333	184
C-X-4	5	4	4670-6050	5036	220-410	278
	Rats femelles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			Valeurs		Valeurs	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X-1	5	6	2010-4340	3260	280-630	470
C-X-3	5	8	3114-4632	3418	546-687	574
C-X-4	2	4	4440-4820	4630	140-370	255
	1(*)	4	-	<u>7570</u>	-	<u>740</u>
C-X-6	4	9	1580-4300	2940	426-500	463
C-Y-2	1(**)	7	-	<u>9024</u>	-	<u>912</u>
	1(***)	8	-	<u>19968</u>	-	<u>1056</u>
	3	10	3811-4157	4784	307-547	391

(*) ratte allaitant sa portée depuis une semaine

(**) " en gestation depuis quinze jours

(***) " ayant mis-bas depuis 24 heures .Dans ces trois cas les valeurs sont soulignées

- TABLEAU XIX -

Variations des réserves (contenus totaux) en vitamine B12
et en cobalamines totales des reins et du foie des rats
normaux de lignées au régime carencé

(moyennes d'ensemble)

	Vitamine B12					
Rats *	Rats mâles			Rats femelles		
	Contenus en mug	Réserves en % des contrôles	Diminution des contrôles	Contenus en mug	Réserves en % des contrôles	Diminution des contrôles
Contrôles Reins	2985(78%)*					
Carencés	261(69%)	7	93	281(70%)	9	91
Contrôles Foie	841(22%)					
Carencés	120(31%)	14	86	118(30%)	14	86
Total Reins + Foie	3826(100%)			399(100%)	10	
	381(100%)	10				
Ecart de variations entre les reins et le foie			7%	5%		

	Cobalamines totales					
Contrôles Reins	2852(74%)					
Carencés	415(54%)	15	85	384(56%)	13	87
Contrôles Foie	1007(26%)					
Carencés	353(46%)	35	65	303(44%)	30	70
Total Reins + Foie	3859(100%)			687(100%)	18	
	768(100%)	20				
Ecart de variations entre les reins et le foie			20%	17%		

* Nombre de rats mâles contrôles : 14. Nombre de rats carencés depuis une ou plusieurs générations : 66 mâles, 60 femelles.

** Pourcentages par rapport aux réserves Reins+Foie

quée pour la vitamine B12. Si les réserves de cobalamines totales des reins des rats de contrôle représentent trois fois celles du foie, par contre ces réserves s'équilibrent presque chez les rats carencés (45-55 p.100 en moyenne). Les diminutions par rapport aux rats de contrôle encore très importantes pour les reins (85-87 p.100) ne sont plus que de 65-70 p.100 pour le foie. Le foie conserve donc un tiers environ des réserves d'origine. De ce fait pour l'ensemble "Reins+Foie" les réserves de cobalamines totales représentent 20 p.100 des réserves des rats de contrôle soit une diminution de 80 p.100. Les cobalamines totales varient donc moins que la vitamine B12 surtout au niveau du foie. La différence de variation au détriment des reins est ici beaucoup plus importante (17 à 20 p.100) que pour la vitamine B12 (TABLEAU XIX). Autrement dit, les reins perdent beaucoup plus de cobalamines que le foie. Cette relative stabilité des cobalamines hépatiques pourrait s'expliquer par le rôle particulier que peut jouer le foie dans le métabolisme des cobalamines, soit sans doute au moment de la dégradation de la vitamine B12, soit peut-être dans une conversion des analogues cobalamines en vitamine B12 en l'absence d'un apport suffisant en celle-ci.

- TABLEAU XX -

Contenus totaux en cobalamines-B12 des reins des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

- TABLEAU XXI -

Contenus totaux en cobalamines-B12 du foie des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

Dans les TABLEAUX XX (pour les reins) et XXI (pour le foie) nous exposons plus en détail, l'évolution des réserves suivant la durée de la carence dans la lignée, c'est-à-dire suivant les générations (Lots CS-1, CX-1 et CY-1) les réserves moyennes de tous les lots restent du même niveau : la plupart des valeurs trouvées pour les cobalamines totales et la vitamine B12 des reins se situent un peu au-dessous de la moyenne générale. Il en est de même pour les cobalamines totales du foie. Cela tient aux valeurs nettement supé-

rieures des premières générations (au régime carencé seulement depuis le sevrage) qui relèvent la moyenne générale ; la même observation est valable pour la vitamine B12 du foie à ceci près qu'il y a une plus grande variation dans les valeurs observées. Nous constatons donc qu'il s'établit une sorte d'équilibre dans la grandeur des réserves et cela tend à confirmer la notion, non seulement que le rat bénéficie d'un apport vitaminique malgré le régime carencé, mais aussi qu'il s'adapte progressivement à la carence alimentaire. Des valeurs légèrement supérieures pour les lots CX-5 et CY-2 s'expliquent en partie, mais non totalement ainsi que nous le verrons lors de l'étude des teneurs par g, par le fait qu'il s'agit d'organes plus gros chez des rats plus âgés (12 et 13 mois). La FIGURE 9 exprime graphiquement l'état des réserves des rats suivant les générations et l'importance relative de ces réserves par rapport aux rats contrôlés : les reins qui représentent la réserve la plus importante sont aussi l'organe qui subit les plus grandes pertes du fait de la carence (*).

- FIGURE 9 -

Réserves en cobalamines-B12 des rats normaux au régime carencé

La capacité tissulaire de fixation des cobalamines et de la vitamine B12 se traduit dans les teneurs par gramme des deux organes étudiés. La comparaison a été faite dans la FIGURE 10 en choisissant une échelle d'ordonnées qui permette de rendre visible les teneurs très diminuées des foies de rats carencés ; les commentaires sur la capacité de fixation comparée des deux tissus paraissent superflus si nous considérons les teneurs des organes tant chez les rats au régime normal que chez les rats au régime carencé .

- FIGURE 10 -

Teneurs/g en cobalamines-B12 des rats normaux au régime carencé

- TABLEAU XXII -

Variations des teneurs en vitamine B12 et cobalamines totales par g des Reins et du Foie des rats normaux de lignées au régime carencé

(*)- Nous n'avons pas cru utile de procéder à une comparaison statistique pour des lots de rats de nombre et âge très différents. Au demeurant les valeurs extrêmes que nous donnons dans les TABLEAUX XX et XXI illustrent assez bien le phénomène général de la baisse et la relative homogénéité de ces valeurs.

- TABLEAU XX -

Contenus totaux en cobalamines-B12 des Reins des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations
(en µg)

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
Contrôles au régime normal	14	2-4	1860-6400	2852	2000-5000	2985
C-S*-1	6	6	600-1380	835	300-460	405
C-X**-1	7	6	1150-1200	1176	313-558	393
X -2	4	4	150-340	262	163-274	235
X -3	7	4-7	210-433	289	132-371	254
X -4	8	3-6	127-323	210	112-299	228
X -5	5	4-13	189-440	303	214-320	252
X -6	9	2-6	130-335	223	125-418	225
C-Y**-1	9	4	323-530	404	132-444	264
Y -2	3	12	174-229	252	207-386	271
Y -3	8	3-7	130-256	186	94-182	125
	Rats femelles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X**-1	7	6	1010-1120	1086	241-395	299
X -2	4	4	290-380	338	239-478	339
X -3	7	4-7	130-407	266	106-361	247
X -4	8	3-6	147-407	276	157-331	226
X -5	5	4-13	261-604	416	182-663	344
X -6	9	2-6	131-409	227	148-451	239
C-Y**-1	9	4	300-570	406	384-555	470
Y -2	3	12	145-378	216	107-265	202
Y -3	8	3-7	84-347	196	86-284	145

* Lot au régime subcarencé (caséine dévitaminée)

** Lignées au régime totalement carencé (farine de soja)

- TABLEAU XXI -

Contenus totaux en cobalamines-B12 du Foie des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations
(en mug)

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
Contrôles au régime normal	14	2-4	758-1670	1007	629-1545	941
C-S*-1	6	6	840-1100	1008	120-280	213
C-X**-1	7	6	708-1032	862	180-492	331
X -2	4	4	115-197	145	59-96	72
X -3	7	4-7	126-352	250	57-163	100
X -4	8	3-6	129-548	234	46-378	122
X -5	5	4-13	212-295	247	30-292	167
X -6	9	2-6	156-301	241	14-100	45
C-Y**-1	9	4	69-205	111	32-101	52
Y -2	3	12	343-451	392	110-190	144
Y -3	8	3-7	128-244	179	7-52	28
	Rats femelles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X**-1	7	6	648-924	787	264-300	293
X -2	4	4	95-207	139	47-102	65
X -3	7	4-7	123-322	222	36-236	72
X -4	8	3-6	160-418	258	73-206	101
X -5	5	4-13	193-512	375	88-576	208
X -6	9	2-6	172-340	279	39-468	144
C-Y**-1	9	4	135-412	216	38-113	60
Y -2	3	12	210-404	271	67-139	88
Y -3	8	3-7	77-354	167	18-107	40

* Lot au régime subcarencé (caséine dévitaminée)

**Lignées au régime totalement carencé (farine de soja)

Réserve en cobalamines - B₁₂ des rats normaux au régime carencé

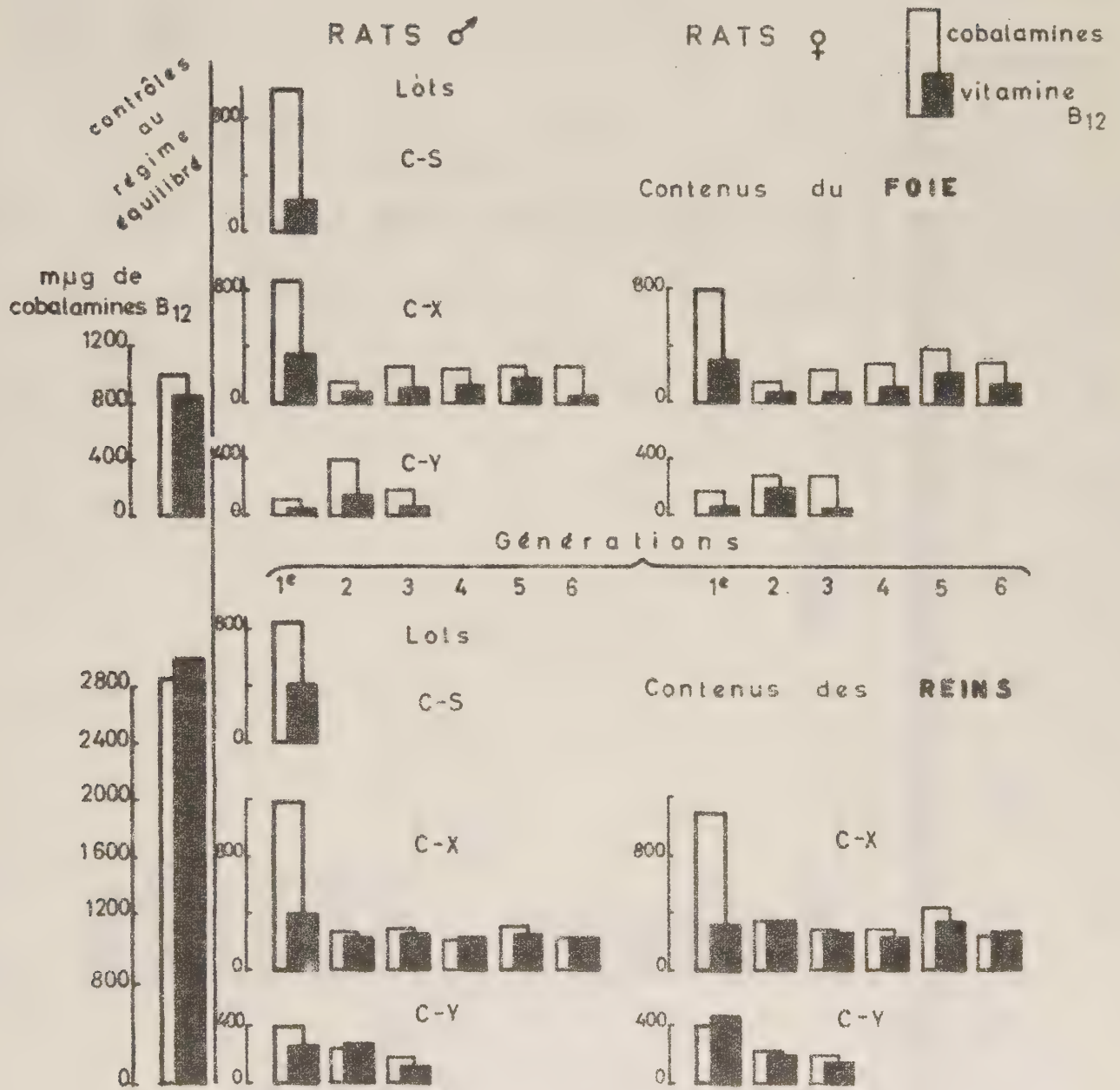
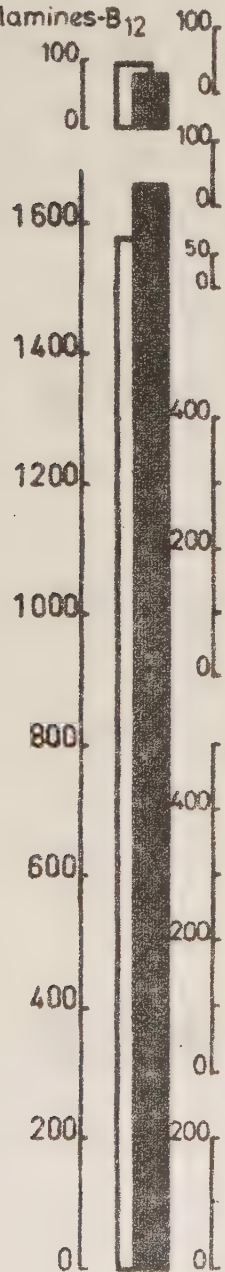


Figure 9

Teneurs/g en cobalamines - B₁₂ des rats normaux au régime carencé

Contrôle au régime équilibré

mpg de cobalamines-B₁₂



RATS ♂

Lots C-S



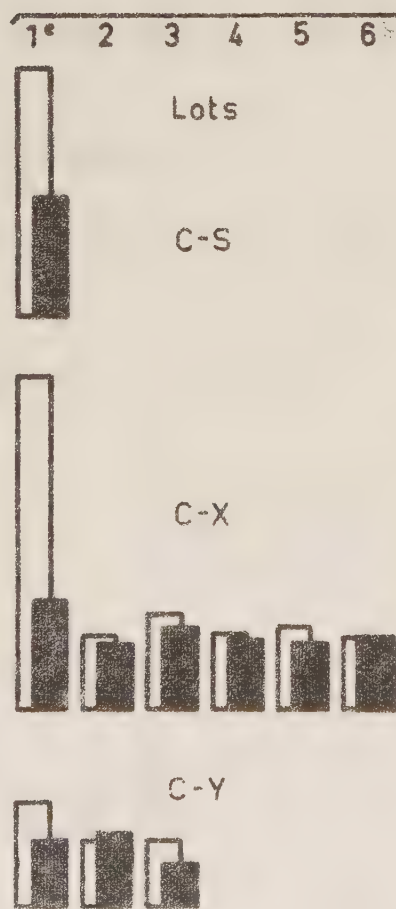
C-X



C-Y



Générations



RATS ♀

cobalamines
vitamine B₁₂

Teneurs du FOIE



Teneurs des REINS

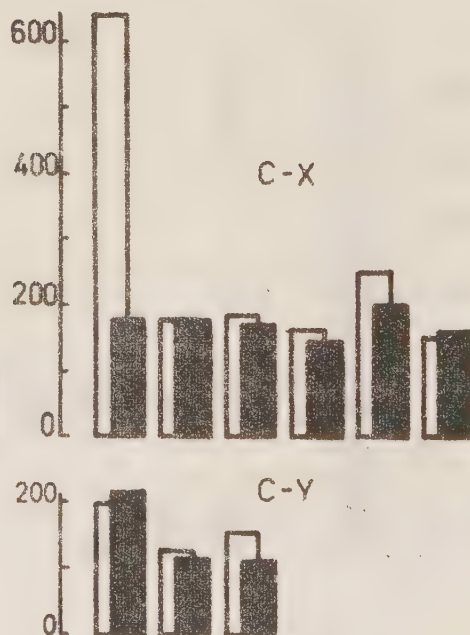


Figure 10

- TABLEAU XXII -

Variations des teneurs en vitamine B12 et cobalamines totales
par g des Reins et du Foie des rats normaux de lignées au
régime carencé

(moyennes d'ensemble)

		Vitamine B12				
Rats*	Rats mâles			Rats femelles		
	Teneurs en µg par g	Réserves en % des	Diminution contrôles	Teneurs en µg par g	Réserves en % des	Diminution contrôles
Contrôles <u>Reins</u>	1858					
Carencés	115	6	94	165	9	91
Contrôles <u>Foie</u>	81					
Carencés	10	12	88	13	16	84
Ecart des variations entre les reins et le foie			6 %	7 %		

		Cobalamines totales				
Contrôles <u>Reins</u>	1775					
Carencés	187	11	89	231	13	87
Contrôles <u>Foie</u>	97					
Carencés	30	31	69	34	35	65
Ecart des variations entre les reins et le foie			20 %	22 %		

* Nombre de rats mâles contrôles: 14. Nombre de rats carencés depuis une ou plusieurs générations: 66 mâles, 60 femelles.

Le TABLEAU XXII donne les résultats moyens d'ensemble de ces teneurs par g. Ici aussi, comme pour les contenus totaux, nous constatons une diminution très importante de vitamine B12 et de cobalamines des reins (de l'ordre de 90 p.100 aussi bien chez les rats mâles que chez les femelles) tandis que la diminution pour le foie, de l'ordre de 85 p.100 en ce qui concerne la vitamine B12, n'est plus que de 65-70 p.100 pour les cobalamines totales. Les variations des teneurs sont différentes chez les rats de l'un ou l'autre sexe. Chez les femelles les réserves restent plus importantes et les diminutions en pourcentage sont systématiquement moins faibles. Nous pouvons dire donc que les rats femelles résistent mieux que les mâles à la diminution considérable des réserves.

- TABLEAU XXIII-

Teneurs par gramme des cobalamines-B12 des reins des rats normaux au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

- TABLEAU XXIV -

Teneurs par gramme des cobalamines-B12 du foie des rats normaux au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

Les valeurs des teneurs par g suivant les générations sont transcrites dans les TABLEAUX XXIII (pour les reins) et XXIV (pour le foie). Les teneurs des rats de première génération, déjà considérablement diminuées, sont cependant plus fortes que celles des générations suivantes. Les poids des organes ne variant guère d'une génération à l'autre nous constatons aussi un palier dans la diminution atteinte par les teneurs par g des cobalamines-B12 chez les générations suivantes. Les valeurs plus fortes des lots CY-2 en contenus totaux ne relèvent pas d'une concentration plus élevée : l'accumulation des réserves chez les rats plus âgés a donc pour origine l'augmentation du poids des organes. Seules les réserves des femelles CX-5 font exception et accusent une nette augmentation en teneur, ce qui est à mettre en parallèle avec une courbe de croissance moyenne particulièrement élevée (FIGURE 8). Enfin la comparaison des valeurs trouvées pour les reins à l'intérieur de chaque lot montre souvent que la totalité des cobalamines rénales se trouve sous forme B12 , nouvel argument en faveur de l'hypothèse qui considère le

rein comme l'organe de réserve de la vitamine B12 proprement dite.

En résumé, malgré la sévérité du régime et une diminution très grande du contenu des reins et du foie, tant en quantité totale qu'en concentration, les générations successives résistent à la carence et maintiennent à un certain niveau les réserves de cobalamines et de vitamine B12. Avec l'âge il peut même y avoir des augmentations du contenu total et de la teneur qui ne peuvent s'expliquer que par l'apport des synthèses intestinales, ces synthèses devenant de plus en plus importantes du fait du développement du volume intestinal et de l'évolution de la flore qui s'enrichit en espèces productrices.

B)- ETUDE DE LA REPRODUCTION -

Si les rats porteurs d'une flore intestinale ne présentent pas, après le sevrage, de signes évidents de carence on peut se demander si le régime carencé n'aurait pas une incidence plus grande tout au début de la vie en considérant-seulement les périodes foetale, néonatale et d'allaitement. En effet, nous avons pu constater, lors de notre première expérience, combien le besoin est grand chez le jeune rat puisque l'ensemble d'une portée contient à la naissance autant de vitamine B12 que les réserves "Foie + Reins" de la mère et au sevrage presque l'équivalent du contenu total de celle-ci. Ce fait permet de mesurer la grandeur de l'emprunt fait à la mère étant donné que les jeunes ne peuvent compter sur leurs propres synthèses (flore intestinale ou prédominent les lactobacilles peu ou pas du tout producteurs de vitamine B12).

Gestation et viabilité des portées -

Sur un ensemble de 22 rattes, deux seulement présentent une absence de gestation prolongée et une des avortements successifs. Dans ce dernier cas (Lot CX-1) il s'agit sans doute d'accidents physiologiques car on ne peut mettre en cause ni la durée de la carence ni la petitesse des réserves de vitamine B12. Par

- TABLEAU XXIII -

Teneurs par gramme des cobalamines-B12 des Reins des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines Totales		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
Contrôles au régime normal	14	2-4	846-4266	1775	873-2961	1858
C-S*-1	6	6	250-726	380	130-2961	178
C-Y**-1	7	6	462-536	507	136-215	167
Y -2	4	4	62-155	108	72-121	98
Y -3	7	4-7	123-206	146	88-156	125
Y -4	8	3-6	71-179	114	62-166	106
Y -5	5	4-13	61-192	124	68-139	101
Y -6	9	2-6	93-153	108	65-157	108
C-Y**-1	9	4	132-183	161	66-153	100
Y -2	3	12	75-127	100	91-138	108
Y -3	8	3-7	54-151	100	39-107	66
	Rats femelles					
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X**-1	7	6	563-747	644	139-219	177
X -2	4	4	161-181	177	133-228	176
X -3	7	4-7	122-290	184	71-228	172
X -4	8	3-6	105-236	168	83-165	143
X -5	5	4-13	163-336	251	139-238	198
X -6	9	2-6	105-191	152	98-208	161
C-Y**-1	9	4	152-271	200	188-250	216
Y -2	3	12	103-146	125	77-139	117
Y -3	8	3-7	56-267	154	58-218	112

* Lot au régime subcarencé (caséine dévitaminée)

** Lignées au régime totalement carencé (farine de soja)

- TABLEAU XXIV -

Teneurs par gramme des cobalamines-B12 du Foie des rats normaux
au régime carencé depuis une ou plusieurs générations

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines totales		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
Contrôles au régime normal	14	2-4	80-140	97	66-130	81
C-S*-1	6	6	77-107	93	11-26	19
C-X** -1	7	6	61-83	72	16-43	28
X -2	4	4	11-15	12	5-8	6
X -3	7	4-7	14-39	23	4-15	10
X -4	8	3-6	14-28	19	5-19	9
X -5	5	4-13	13-22	18	3-18	11
X -6	9	2-6	9-42	22	2-6	4
C-Y** -1	9	4	5-19	8	3-8	4
Y -2	3	12	28-34	31	9-14	11
Y -3	8	3-7	11-24	17	1-5	3
	Rats femelles					
	Nombre	Age en mois	Cobalamines totales		Vitamine B12	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
C-X** -1	7	6	69-111	89	30-36	33
X -2	4	4	7-14	10	4-6	5
X -3	7	4-7	16-49	31	5-29	10
X -4	8	3-6	14-35	25	6-16	9
X -5	5	4-13	20-50	40	11-65	23
X -6	9	2-6	22-57	37	7-42	16
C-Y** -1	9	4	12-33	19	3-8	5
Y -2	3	12	14-38	30	5-13	9
Y -3	8	3-7	9-48	24	2-14	6

* Lot au régime subcarencé (caséine dévitaminée)

** Lignées au régime totalement carencé (farine de soja)

- TABLEAU XXV -

Viabilité des portées des rattes normales au régime totalement
carencé en vitamine B12 depuis une ou plusieurs générations

Lots et générations des rattes	Nombre de rattes	Nombre de nouveaux -nés	Mortalité néonatale (48 heures)	Nombre de ratons allaités	Mortalité durant l'allaitement
Lot CX-1	5	31	2 (6%)	8 (*)	3 (37%)
CX-2	3	23	0	23	4 (17%)
CX-3	2	25	9 (36%)	16	1 (6%)
CX-4	4	28	3 (11%)	25	2 (8%)
CX-5	2	24	0	24	0
Total		131	14 (11%)	96	10 (10%)
Lot CY-1	4	38	0	38	0
CY-2	2	20	0	20	0
Total		58	0 (0%)	58	0 (0%)

(*) Pour le lot CX-1 la plupart des ratons ont été sacrifiés précocement aux fins d'analyse; ceux d'une seule portée, de 8 au départ, ont été conservés jusqu'au sevrage.

contre, pour les deux autres rattes (Lot CX-4) nous sommes en présence d'animaux très amaigris (140 g à trois mois au lieu de 200 en moyenne pour les rattes de même génération). Il se pourrait donc que ces deux rattes soient en état de carence B12, d'autant que les teneurs en cobalamines-B12 sont plus ou moins abaissées dans leurs organes de réserve. Nous ne nions pas qu'il ne puisse y avoir des défauts d'adaptation des rats à microflore autochtone au régime totalement carencé en vitamine B12. Mais tout compte fait 2 cas sur 22 ne constituent pas une proportion considérable et on peut dire que, sur l'ensemble des rattes observées, le pourcentage de réussite des gestations est tel qu'à aucun moment il n'y a danger pour la conservation de la lignée.

- TABLEAU XXV -

Viabilité des portées des rattes normales au régime totalement carencé en vitamine B12 depuis une ou plusieurs générations

Le TABLEAU XXV renseigne sur la viabilité des portées immédiatement après la naissance ou durant l'allaitement chez les rattes venues à terme. On voit que, comme pour les avortements, le pourcentage d'échec après mise-bas ne met pas en péril la continuité de la lignée. Toutefois cette continuité ne va pas sans accidents ainsi que l'on peut voir pour les portées du lot CX-3, proportionnellement les plus atteintes.

On ne saurait manquer d'établir un rapprochement entre ces mortalités et la médiocre croissance chez les rats de cette génération CX-3 (FIGURE 8). Tout porte à penser qu'il y a retentissement de cet état déficient sur les possibilités de mener à bien les différentes étapes de la reproduction.

Cependant, force est de constater que, dans l'ensemble, les rats normaux ayant leur flore intestinale autochtone, résistent assez bien à l'absence d'apport alimentaire en vitamine B12.

Contenus et teneurs en cobalamines-B12 chez les rattes et leurs portées.

Bien que les analyses ne concernent pas des échantillons prélevés systématiquement tout au long des générations des

différents lots étudiés, nous avons fait un certain nombre de dosages qui modifient et précisent les résultats obtenus lors de la première expérience.

Contenus et teneurs chez les mères -

Nous reprenons dans le TABLEAU XXVI les valeurs moyennes de 5 rattes du lot CX-1, déjà analysées en y joignant des données provenant de rattes sacrifiées des lots CX-4, CY-2 et CZ-1 ayant eu des portées étudiées ci-dessous qui vont des foetus de 10-12 jours avant la mise-bas à des jeunes rats au sevrage. Ces valeurs provenant d'animaux au régime totalement carencé à base de farine de soja nous les comparons aux valeurs obtenues chez 2 rattes du lot CB₁₂ maintenues au même régime complété par le supplément de vitamine B12 du régime équilibré (5000 mg/rat/jour) qui excède de beaucoup les besoins . Les valeurs des foies et des reins sont additionnées en un total partiel puis ajoutées aux valeurs de la carcasse en un total général.

- TABLEAU XXVI -

Cobalamines et vitamine B12 chez les Rattes à flore microbienne
après gestation (contenus totaux et teneurs par g)

Que pouvons-nous dire ? Les quantités de vitamine B12 et de cobalamines varient notablement d'un animal à l'autre, tant dans les organes de "réserve" que dans la carcasse, mais le tissu rénal reste le plus riche. A souligner qu'on ne trouve pas de parallélisme entre le contenu des "réserves" et celui de la carcasse : les réserves mobilisables (Foie + Reins) sont nettement plus élevées chez les rats recevant de la vitamine B12 (lot CB₁₂) que chez les carencés (lots CX,CY et CZ) alors que, curieusement, le contenu de la carcasse peut être supérieur chez les seconds (il faut noter que, dans ces cas, le tractus digestif et son contenu inclus dans les dosages représentent environ 80 p.100 des valeurs de la carcasse). Les teneurs par g donnent en gros les mêmes indications : l'apport alimentaire de vitamine B12 se traduit essentiellement par l'augmen-

- - TABEAU XXVI - -

Cobalamines et vitamine B12 chez les Rattes à flore microbienne après gestation

Lots et généra- tions	Age des rattes (mois)	Date de mise- bas (jours)	Contenus totaux										
			Cobalamines totales (mg)					Vitamine B12 (mg)					
			Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	
(Régime carencé)													
5 CX-1	5	1	787	1086	<u>1873</u>	10450	<u>12323</u>	293	299	<u>592</u>	1470	<u>2062</u>	
1 CX-4	6	-10 ^(*)	160	214	<u>374</u>	-	-	73	214	<u>287</u>	-	-	
1 CX-4	5	21	418	396	<u>814</u>	-	-	206	183	<u>389</u>	-	-	
1 CY-2	7	1	210	268	<u>478</u>	13800	<u>14278</u>	76	240	<u>316</u>	1139	<u>1455</u>	
1 CY-2	8	1	416	337	<u>753</u>	24480	<u>25283</u>	85	279	<u>364</u>	1380	<u>1744</u>	
1 CZ-1	4	1	160	144	<u>304</u>	6200	<u>6504</u>	59	160	<u>219</u>	5640	<u>5859</u>	
1 CZ-1	3	9	330	104	<u>434</u>	8640	<u>9074</u>	90	71	<u>161</u>	5200	<u>5361</u>	
1 CZ-1	3	9	349	126	<u>475</u>	12160	<u>12635</u>	123	77	<u>200</u>	4440	<u>4640</u>	
(Régime équilibré)													
1 CB ₁₂ -1	3	9	1210	1069	<u>2279</u>	7640	<u>9919</u>	582	426	<u>1008</u>	4880	<u>5888</u>	
1 CB ₁₂ -1	4	16	551	2040	<u>2591</u>	27600	<u>30191</u>	282	918	<u>1200</u>	2440	<u>3640</u>	
Teneurs par g													
(Régime carencé)													
5 CX-1	5	1	89	644		46		33	177		6		
1 CX-4	6	-10 ^(*)	14	146		-		6	146		-		
1 CX-4	5	21	32	180		-		16	83		-		
1 CY-2	7	1	14	128		47		5	114		4		
1 CY-2	8	1	22	140		79		5	116		4		
1 CZ-1	4	1	18	111		37		7	123		34		
1 CZ-1	3	9	35	65		52		9	44		31		
1 CZ-1	3	9	42	90		79		14	55		29		
(Régime équilibré)													
1 CB ₁₂ -1	3	9	121	779		42		58	284		27		
1 CB ₁₂ -1	4	16	48	1020		120		25	459		11		

(*) Foetus de 10-12 jours

- TABLEAU XXVII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de rats normaux à la naissance
(en μg)

Lots et généra- tions	Nombre	Age (jours)	Contenus totaux		Contenus par rat		Teneurs par g	
			Coba- lamines	Vitamine B12	Coba- lamines	Vitamine B12	Coba- lamines	Vitamine B12
(régime carencé)								
CX-2	9	1	1840	730	204	81	26	10
CX-2	8	1	1620	720	202	90	33	15
CX-2	8	1	1840	520	230	65	31	11
CX-4	5	1	160	147	32	29	7	6
CX-5	7	10(*)	35	18	5	2,6	3,2	1,6
CX-5	8	1	678	32	85	4	15	0,7
CY-3	6	1	125	8	21	1,3	5	0,3
CY-3	8	1	402	53	50	7	8	1,0
CZ-2	6	1	648	444	108	74	19	13
(régime équilibré)								
CB ₁₂ -2	2(**)	1	430	155	215	77	42	15

(*) Foetus de 10-12 jours

(**) Ne représentent sans doute pas la totalité de la portée

tation des réserves rénales et hépatiques. Il ne semble pas qu'il y ait une incidence bien définie ni de l'âge des mères ni de l'âge des portées. Enfin d'une génération carencée à l'autre ces réserves tendent à diminuer; 592 μ g de vitamine B12 pour le total "Foie + Reins" en CX-1 et 338 μ g (chiffre moyen) en CX-4.

Contenus et teneurs chez les ratons à la naissance -

Les valeurs présentées dans le TABLEAU XXVII concernent presque uniquement des nouveau-nés (sauf une portée de foetus à mi-gestation, lot CX-5) provenant de divers lots et générations et reprenant les trois portées déjà étudiées du lot CX-2. Nous les avons comparés avec 2 ratons d'une mère recevant un régime dit "équilibré" (riche en vitamine B12) qui représentent nos rats témoins (lot CB₁₂-2). Il est aisé de voir que les ratons provenant de mères de première génération (lots CX-2, CZ-2 et CB₁₂-2), qu'elles soient ou non au régime carencé, contiennent à peu près les mêmes quantités de cobalamines et de vitamine B12; les teneurs par gramme sont également très proches. Cela tendrait à prouver que ces valeurs ont une signification fonctionnelle pour le nouveau-né et que l'état de nutrition de la mère influence peu son contenu en vitamine B12. Nous verrons qu'il n'en est pas du tout de même en ce qui concerne les valeurs des rats en période d'allaitement.

- TABLEAU XXVII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de rats normaux à la naissance

Chez les ratons de générations ultérieures (lots CX-4 et 5, CY-3) nous constatons, par contre, des valeurs très inférieures principalement en vitamine B12 laquelle ne représente plus que le 1/10ème ou moins des valeurs de la 2ème génération. Les valeurs en cobalamines totales, quoique très basses, peuvent atteindre la moitié des valeurs initiales. Or, nous avons constaté la croissance presque normale des portées : nous pouvons l'expliquer soit par la

possibilité d'utiliser les synthèses intestinales des mères qui fournissent la vitamine à la demande, soit par un rôle fonctionnel des analogues cobalamines dont les contenus et teneurs sont encore considérables.

- FIGURE 11 -

Réerves en cobalamines-B12 des rattes normales et de leurs portées
au régime carencé

Le contraste entre l'incidence du prélèvement par les portées dans la 2ème génération et celui des portées de générations ultérieures est bien mis en valeur par la FIGURE 11 (voir portées de 24 heures). La comparaison des contenus des mères et de ceux des portées indique que pour la 1ère génération le besoin des portées semble assuré quantitativement jusqu'à la naissance. A partir de la deuxième génération, le besoin de la mère semble primer, puisque les contenus totaux des portées (CY-3) en vitamine B12 ne représentent plus que 1/6ème à 1/40ème des contenus "Foie + Reins" des mères (CY-2) (voir aussi les données des TABLEAUX XXVI et XXVII pour le lot CY).

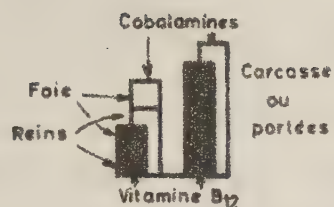
Contenus et teneurs chez les portées de jeunes rats -

Les valeurs que nous rapportons dans le TABLEAU XXVIII ne sont pas très nombreuses pour chaque âge donné. Elles suffisent cependant à donner une idée de l'évolution des contenus en cobalamines-B12 et de leur mise en réserve.

- TABLEAU XXVIII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de jeunes rats
normaux

Les contenus totaux en vitamine B12 augmentent très nettement avec l'âge par rapport à ceux des portées à la naissance (TABLEAU XXVII), même pour le lot CY-3 constitué seulement de 2 rats. Les écarts entre les portées de 2ème génération et celles des générations ultérieures sont moins grande qu'à la naissance, surtout pour les cobalamines totales, c'est donc qu'une compensation au



Réserve en cobalamines - B₁₂ des ratte normales
et de leurs portées au régime carencé.

mpg de
cobalamines-
B₁₂

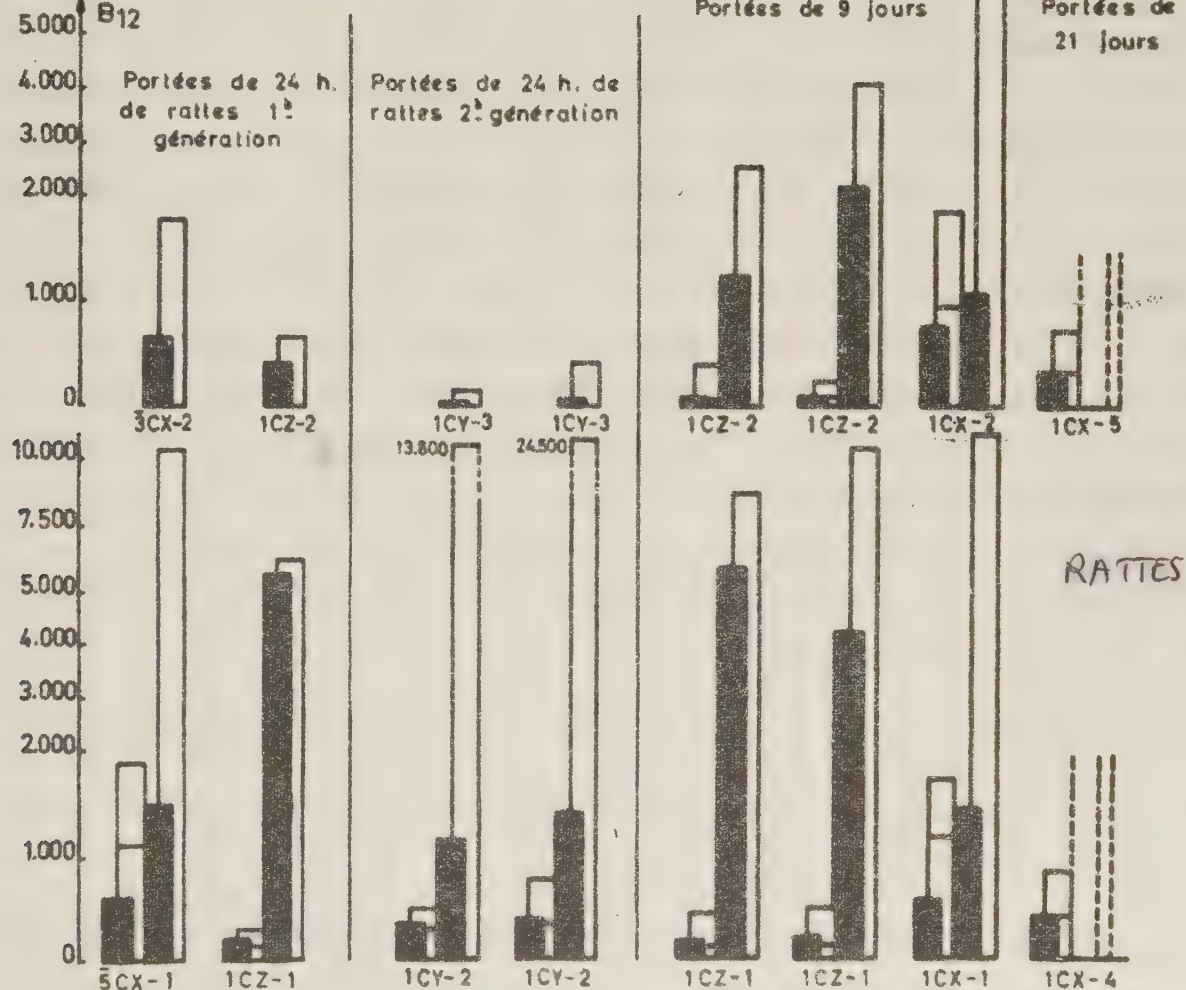


Figure 11

- TABLEAU XXVIII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de jeunes rats normaux (en mg)

Lots et généra- tions	Nombre	Age (jours)	Contenus totaux										
			Cobalamines totales				Vitamine B12						
			Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	
(Régime Carence)													
CX-2	5	21	898	934	<u>1832</u>	11640	<u>13472</u>	352	404	<u>756</u>	1080	<u>1836</u>	
CX-5	8	21	384	326	<u>710</u>	-	-	108	200	<u>308</u>	-	-	
CX-5	6	30	178	124	<u>302</u>	4177	<u>4479</u>	68	52	<u>120</u>	349	<u>459</u>	
CY-3	2	14	145	182	<u>327</u>	695	<u>1022</u>	59	81	<u>140</u>	60	<u>200</u>	
CZ-2	8	9	316	58	<u>374</u>	2560	<u>2934</u>	46	18	<u>64</u>	1220	<u>1284</u>	
CZ-2	8	9	145	82	<u>227</u>	4200	<u>4427</u>	51	13	<u>64</u>	2080	<u>2144</u>	
(Régime équilibré)													
CB ₁₂ -2	7	9	850	3092	<u>3945</u>	9504	<u>13499</u>	562	1800	<u>2362</u>	8808	<u>11170</u>	
CB ₁₂ -2	7	16	2140	9120	<u>11260</u>	8240	<u>19500</u>	381	8000	<u>8381</u>	1960	<u>10341</u>	
Teneurs par grammes													
(Régime carencé)													
CX-2	5	21	48	267		58		19	115		5		
CX-5	8	21	25	80		-		7	42		-		
CX-5	6	30	43	134		50		17	57		4		
CY-3	2	14	39	114		7		16	50		0,6		
CZ-2	8	9	83	36		22		12	11		11		
CZ-2	8	9	35	51		37		12	8		18		
(Régime équilibré)													
CB ₁₂ -2	7	9	135	1407		61		89	818		53		
CB ₁₂ -2	7	16	163	2400		33		29	2105		8		

défaut du régime s'exerce dès la période d'allaitement. Certaines de ces valeurs ont été transcrites dans la FIGURE 11 lorsque des analyses correspondantes ont été faites pour les mères et les portées. Outre les valeurs augmentées avec l'âge, nous remarquerons que, suivant les lots (CZ ou CX), les proportions des réserves diffèrent avec prédominance des foies et reins ou de la carcasse. Nous notons enfin que les réserves du foie et des reins tendent à équivaloir celles de la mère même à la 5ème génération et gardent une distribution, avec la carcasse, proportionnelle à celle de la mère, ce qui serait peut-être une caractéristique propre à la lignée (cf. partie droite de la FIGURE 11, lots CZ et CX).

Cependant, les teneurs par gramme du TABLEAU XXVIII indiquent aussi que les variations ne sont pas dues uniquement aux augmentations pondérales des organes : nous constatons que les teneurs du foie sont plutôt stables tandis que les teneurs des reins augmentent avec l'âge et que les teneurs des carcasses diminuent. Cette évolution générale se trouve confirmée par les données des portées CB₁₂⁻² au régime normal. Nous avons dans ce cas des facilités de mise en réserve de la vitamine B12, très abondante dans le régime. Or, nous voyons que non seulement les teneurs en vitamine B12 de la carcasse mais aussi celles du foie diminuent avec l'âge tandis que celles des reins deviennent considérables. Il est vraisemblable qu'en approchant du sevrage les reins se constituent en tant que lieu de réserve privilégié pour la vitamine B12, ce qu'ils resteront par la suite tout le long de la vie adulte de l'animal.

Que peut-on conclure de l'ensemble de ces données ? Sur le plan de la reproduction, les rats normaux ayant leur flore intestinale résistent à la privation la plus sévère de vitamine B12 dans le régime. Cette carence alimentaire n'affecte sensiblement ni les gestations, ni la mortalité néo-natale ni celle du jeune âge. De même, contrairement à ce que nous verrons en ce qui concerne les rats axéniques, nous n'avons constaté chez nos rats normaux soumis

au même régime carencé et que nous considérons comme les témoins de l'élevage axénique aucune apparition de malformations congénitales. Sur le plan de la carence nous n'avons jamais constaté une atteinte de la lignée sanguine, ainsi qu'il est classique de la trouver chez l'homme, et même si dans certains cas individuels en infime proportion nous avons une croissance ralentie s'accompagnant d'un aspect déficient elle ne se traduisait pas, non plus, par une anémie.

Sur le plan des réserves la diminution est notable tant chez l'adulte que chez le jeune rat mais elle semble atteindre un palier à partir de la 3ème ou 4ème génération, palier qu'elle ne dépasse pas et pour lequel il faut évoquer une certaine adaptation des lignées, cette adaptation étant liée aux possibilités d'apport en cobalamines-B12 par les synthèses intestinales. Il est même probable qu'une adaptation meilleure se fait sentir à l'âge adulte où, pour des réserves proportionnellement analogues, accrues seulement en valeur absolue, et pour des besoins moins importants, nous assistons à un redressement et normalisation de la courbe pondérale. On ne peut s'empêcher de penser, en outre, qu'il y a un enrichissement progressif de la flore intestinale avec l'âge, en quantité et en variété d'espèces, et aussi en pouvoir de synthèse des cobalamines, et que ce fait doit finir par assurer ou compléter la couverture du besoin vitaminique B12 chez le rat adulte.

IV-EFFETS DE LA CARENCE B12 CHEZ LES RATS AXENIQUES DE =====

PLUSIEURS GENERATIONS - =====

Lors de l'étude comparée des effets du régime totalement carencé chez les rats normaux et les rats axéniques on a pu voir que ces derniers étaient incapables de mener à bien leur reproduction. En effet, la mortalité atteignait 100 p.100 en 48 heures (lot AL-2). On obtient des résultats analogues avec d'autres rats au même régime (lots AM, AO et AP). Le seul moyen de pouvoir

étudier les effets de la carence B12 sur plusieurs générations était de fournir aux rattes en gestation un apport minimum de vitamine B12; qui leur permette de faire face au déficit en vitamine imposé par les besoins de la portée tout en évitant de reconstituer les réserves de la mère au point d'effacer les effets précédents du régime. Il ne nous échappait pas combien ce minimum d'apport serait délicat à déterminer : il fallait qu'il suffise à sauvegarder les différentes étapes de l'embryogénèse et de la croissance du jeune rat tout en maintenant la mère en état de déficience certaine, faute de quoi l'état de carence ou de subcarence ne pourrait être réalisé.

Inévitablement nous allions au devant de tâtonnements peu susceptibles de permettre une expérimentation nette et tranchée sur une échelle assez grande; notamment à cause de la lourdeur de la mise en oeuvre de moyens lorsqu'il s'agit d'un élevage axénique. Nous avons tenté d'abord de faire reproduire des rats axéniques au régime subcarené (à base de caséine dévitaminée représentant un apport d'environ 10 mp_g de vitamine B12/rat/jour, rats AN-1). Puis pour plus de précision nous avons ajouté au régime totalement carencé (farine de soja délipidée), un supplément de vitamine B12 à des doses de 10-20 mp_g/rat/jour (rats AN-2 et générations suivantes), et enfin suivant les réussites ou les échecs des reproductions, certains lots ont été soumis à des changements d'apport de vitamine, soit qu'on alterne le régime totalement carencé et le subcarené, soit qu'on les mélange pour réaliser un régime intermédiaire au point de vue de l'apport vitaminique, soit qu'on substitue simplement un régime à l'autre en cours d'expérience. Ainsi les rattes du lot AP bien qu'elles fussent placées au régime totalement carencé durant toute leur croissance, ont bénéficié, durant 10 jours environ avant la mise-bas, d'un apport de 20 mp_g/ratte/jour.

Pour faciliter l'exposition des résultats nous grouperons les différentes expériences suivant que la mise en carence représente un apport de 10 mp_g par rat et par jour ou de 20 mp_g par rat et par jour, quitte à préciser plus en détail la nature du régime alimentaire ou les modalités du passage de l'un à l'autre.

Enfin, l'importance primordiale des observations sur la reproduction du rat axénique nous incite à inverser l'ordre d'exposition adopté jusqu'à présent et à traiter en premier des effets du régime sur différentes étapes de la reproduction : gestation, mise-bas, viabilité des portées, état nutritionnel des ratons.

A)- ETUDE DE LA REPRODUCTION -

L'étude de la première gestation des rattes axéniques ayant subi un régime totalement carencé depuis leur sevrage, soit seulement pendant 3-4 mois, nous avait déjà montré l'impossibilité pour les mères d'assurer la dépense en vitamine B12 correspondant aux différentes étapes de l'embryogénèse et de l'allaitement.

Nous avons repris cette étude au cours d'autres expériences où ont été testés les effets des différents régimes que nous grouperons suivant l'apport en vitamine B12.

Gestation et viabilité des portées -

Le TABLEAU XXIX résume l'ensemble des résultats concernant la reproduction de rattes axéniques (y compris la première étude comparée des rats axéniques avec les rats normaux) et la viabilité de leurs portées suivant le régime administré. Nous n'avons pas mentionné les essais de reproduction des rats axéniques recevant un supplément "normal" en vitamine B12 c'est-à-dire aux doses habituelles de notre élevage, déjà rapportées, et qui sont très supérieures aux besoins ; qu'il suffise de signaler qu'avec les 5 rattes témoins ayant eu des portées entre 8 et 11 ratons, soit un total de 48 ratons, il n'y a pas eu un seul décès néonatal.

- TABLEAU XXIX -

Reproduction et viabilité des portées de rattes axéniques au régime carencé ou subcarencé

Un régime totalement carencé en vitamine B12, imposé au rat axénique, affecte les fonctions de reproduction à tous

- TABLEAU XXIX -

Reproduction et viabilité des portées de rattes axéniques au régime carencé
ou subcarencé

Lots et génération des rattes	Apport en vitamine B12 : nul									
	1er accouplement			2ème accouplement			3ème accouplement			
	Gesta- tion	Mise- bas	Ratons mortalité en 48h	Gesta- tion	Mise- bas	Ratons mortalité en 48h	Gesta- tion	Mise- bas	Ratons mortalité en 48h	
AL-1	5/5	4/5	35/35 100%							
AM-1	4/5	2/4	12/18 66%	0/5	-	-				
AO-1	3/4	3/3	11/11*100%	-	-	-				
AP-1 (xxx)	6/7	5/6	42/46 91%	3/7	0/3	-	2/7	2/2	13/13 100%	
AN-4				3/9	0/3**					
			Apport en vitamine B12 : 10 µg/r/jour							
AN-1	7/7	7/7	5/51 *** 10%	2/3	1/2	6/6 100%				
AN-2	9/9	9/9	35/44 80%	5/5	4/5	28/32 87%				
AN-4	6/9	5/6	24/24 100%							
			Apport en vitamine B12 : 20 µg/r/jour pendant 1 mois d'accouplement-gestation							
AN-2				4/4	4/4	10/27 37%	8/9	8/8	26/61 43%	
				4ème accouplement			5ème accouplement			
				7/9	7/7	7/49 *** 14%	5/9	5/5	6/25 *** 24%	
				2ème accouplement			3ème accouplement			
AN-3	4/4	4/4	7/17 41%	4/4	4/4	18/23 78%	4/4	4/4	10/10 100%	
				4ème accouplement			5ème accouplement			
				3/3	3/3	12/12 100%	2/2	2/2	6/6 100%	

(x) Au numérateur le nombre de gestation, au dénominateur celui des accouplements

(xx) au numérateur le nombre de mise-bas, au dénominateur celui des gestations: l'écart représente les avortements connus

(xxx) apport en vitamine B12 limité à 10 jours avant la mise-bas : 20 µg/jour

(*) 2 exencéphales et 1 méningocèle (lot AO 2-1)

(**) chez 2 rattes sacrifiées avant terme : 2 foetus non malformés, 2 exencéphales et 10 résorptions foetales (lot AN 5-2)

(***) 3 Hydrocéphales anophtalmes (AP N-1), 6 hydrocéphales légers (AN 3-4) et 1 hydrocéphale anophtalme (AN 3-5)

les stades selon l'intensité de l'avitaminose. Au début les ratte sont encore fertiles et les premiers accouplements sont le plus souvent suivis de gestations. A mesure que l'état carencé s'accroît la fertilité diminue et de nombreuses femelles deviennent stériles (voir résultats du 2ème accouplement, TABLEAU XXIX). On observe la même évolution pour la mise-bas : au 1er accouplement, 14 mises-bas pour 18 gestations ; au second accouplement, aucune mise-bas pour 6 gestations par suite d'avortements ou de résorption in utero. A l'autopsie pratiquée une semaine avant le terme (ratte AN-4) ou à la naissance (ratte AO-1) on relève des malformations sur lesquelles nous reviendrons. Quant à la mortalité néo-natale globale elle est déjà très élevée lors du 1er accouplement (91 p.100) pour atteindre 100 p. 100 par la suite. Ainsi les réactions à la carence B12 se font d'abord sentir au niveau de la période néo-natale, puis à celui de la gestation avant que les fonctions ovariennes de la mère ne soient dérèglées. C'est un nouvel exemple de la priorité dont jouit la mère lorsqu'il s'agit du besoin vitaminique : en règle générale les avitaminoses touchent en premier l'enfant avant de s'extérioriser chez la mère (JACQUOT, 92).

Un certain nombre de rats axéniques a été placé au régime à base de farine de soja subcarencé en vitamine B12. Sur la base d'une ingestion journalière de 20 g de nourriture l'apport vitaminique B12 est de 10 µg. En fait, les consommations réelles ont varié de 11 à 17 g ce qui représente 6 à 8 µg de cyanocobalamine par rat et par jour. Ces faibles doses assurent un fonctionnement ovarien normal puisque la plupart des accouplements sont suivis de gestation, soit en tout : 33 accouplements et 29 gestations. Lors du 1er accouplement toutes les gestations, à une exception près, se soldent par une mise-bas normale ; de même on note pour le 2ème accouplement 5 mises-bas pour 7 gestations. A nouveau, la subcarence atteint directement la portée : la première génération n'accuse qu'une faible mortalité néonatale (10 p.100) mais à l'allaitement plusieurs ratons présentaient des malformations graves de l'encéphale et de l'ap-

pareil optique. Puis la mortinatalité devient très importante tant pour les gestations que pour les générations successives. Le régime subcarencé apportant théoriquement 10 μg de vitamine B12 par ratte et par jour améliore les gestations mais ne permet pas le développement des portées.

Pour essayer d'obtenir des adultes plus nombreux susceptibles de donner un tableau complet de la carence nous avons tenté d'améliorer le rendement de la reproduction en doublant la dose de vitamine B12 de manière à réaliser un apport de 20 μg /rat/jour pendant une période limitée à un mois après l'accouplement, temps qui, compte tenu d'une fécondité non retardée, couvrirait la durée de la gestation. L'amélioration s'est fait nettement sentir : le lot AN-2, partagé en deux pour la 2ème gestation, présentait une mortinatalité de 37 p.100 avec le nouveau supplément au lieu de 87 p.100 avec le régime précédent. Malgré la perte en vitamine que représente chaque portée cette dose de 20 μg se révélait suffisante puisque les taux de mortalité néo-natale des gestations suivantes étaient respectivement de 43, 14 et 24 p.100. Cette amélioration tend à indiquer que la dose quotidienne de 20 μg de cyanocobalamine permet à la mère d'édifier un minimum de réserves qu'elle utilise lors des gestations successives. Cependant le même protocole appliqué à la 3ème génération ne se révèle pas aussi efficace : après la première gestation la mortinatalité n'est que de 41 p.100, elle atteint 78 p.100 avec la deuxième et les gestations ultérieures ne présentent plus de survivant.

Il semble que cette dose de 20 μg de vitamine B12, allouée seulement pendant le mois d'accouplement-gestation représente la quantité limite pour obtenir des portées sans pour autant permettre la constitution de réserves importantes.

Les malformations observées ont été notées dans le TABLEAU XXIX par des renvois en bas de page pour les portées en cause (Lots AO 2-1, AN 5-2, AN 2-1, AN 3-4 et AN 3-5, le premier chiffre de chaque lot indiquant la génération et le deuxième la gestation). Avant de les décrire nous noterons seulement qu'elles ne sont pas très nombreuses : 1 méningocèle et 4 exencéphales chez les foetus et nou-

veau-nés, 4 hydrocéphales graves et 6 hydrocéphales légers pour les jeunes rats en allaitement. Il n'est pas possible de donner des pourcentages valables surtout pour les malformations de la vie intra-utérine car nombre d'arrêts de gestation ou de résorptions in utero doivent se produire à la suite d'anomalies foetales passées inaperçues. De même les hydrocéphalies limitées à la période de l'allaitement doivent présenter divers degrés de gravité : faute d'observations très suivies certains débuts d'hydrocéphalie ont pu rester ignorés et d'autres plus graves aboutir à une élimination précoce, la mortalité de la période d'allaitement étant élevée mais n'ayant pas fait l'objet d'une étude particulière. Quoi qu'il en soit nous noterons ici que les cas de malformations foetales surviennent dans les portées à 100 p.100 de mortalité néonatale ou d'avortement tandis que les cas d'hydrocéphalie étaient le fait des portées chez qui cette léthalité à la naissance était relativement modérée (10 à 24 p.100).

En conclusion, il est confirmé que l'absence de vitamine B12 du régime ne permet pas à la lignée de rats axéniques de se maintenir en se reproduisant. Les quelques survivants de la période cruciale de la mise-bas sont très peu nombreux et dans un état déficient qui sera décrit plus loin. La dose de 10 μ g par jour de vitamine ne permet pas, non plus, d'obtenir des portées viables. Si les résultats de la première gestation sont assez favorables avec 90 p.100 de survivants il n'en est pas de même pour les gestations ou les générations subséquentes. Par contre cette dose suffit amplement à l'adulte qui n'a plus à faire face aux besoins de la reproduction et, en fait, les rats axéniques adultes placés au régime fournissant 10 μ g de vitamine B12 par jour montrent les signes de la bonne santé apparente. On peut même dire que, si nécessaire, cette dose devrait pouvoir encore être diminuée puisque, lors de l'expérience de mise en carence comparée des rats de première génération (axéniques-normaux au régime totalement carencé) aucun signe de carence n'a été observé en dehors d'une sévère diminution des réserves vitaminiques.

Enfin, une dose de 20 μ g par jour, allouée pendant une courte période suffit pour assurer un certain nombre de gestations

successives avec une mortalité néonatale réduite. Il n'était pas nécessaire de cumuler d'autres expériences pour estimer que cette même dose donnée en permanence, voire même une dose intermédiaire de 15 mpg de vitamine B12 par jour, doit couvrir le besoin total de maintien de la lignée puisqu'il y a possibilité d'accumulation dans les réserves lors des périodes non reproductives.

Malformations des embryons ou des jeunes rats -

Nous donnons ici une description générale succincte, et sans valeur anatomo-pathologique, des anomalies tératogènes observées.

- Chez le fœtus, la malformation la plus fréquente est l'exencéphalie. Elle consiste en un défaut de coalescence de la boîte crânienne au niveau de l'occiput. Le cerveau, très apparent, peut être observé à nu sur un quart au moins de sa longueur, ainsi qu'on peut le voir par les FIGURES 12 et 13. Nous avons noté chez deux exencéphales à la naissance (Lot AO-2), un poids très inférieur à la normale, une taille plus courte, des extrémités moins longues et réduites, les doigts étant à peine marqués, une absence d'ébauches optiques et auditives; le museau par contre n'apparaît pas déformé. Dans un autre cas où nous avons trouvé deux exencéphalies fœtales bien avant la mise-bas, on ne remarquait d'autre différence par rapport aux frères de la même portée (FIGURE 12). Il était difficile de savoir si l'ensemble de ces fœtus présentait un retard évolutif de taille et de poids puisque nous manquions d'éléments de comparaison (ignorance de l'âge exact de ces fœtus et absence de fœtus de même âge appartenant à des portées normales).

- FIGURE 12 -

Ensemble d'une portée de fœtus comportant deux exencéphales et 3 résorptions fœtales

- FIGURE 13 -

Fœtus exencéphales au 15ème jour de la gestation

Le seul cas de méningocèle observé se présentait ainsi : une hernie des enveloppes méningées de la taille d'un pois cassé

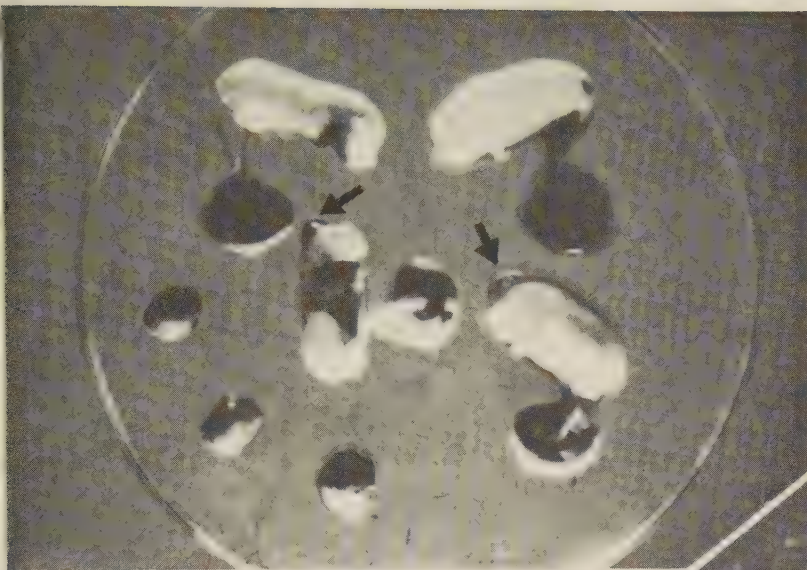


FIGURE 12

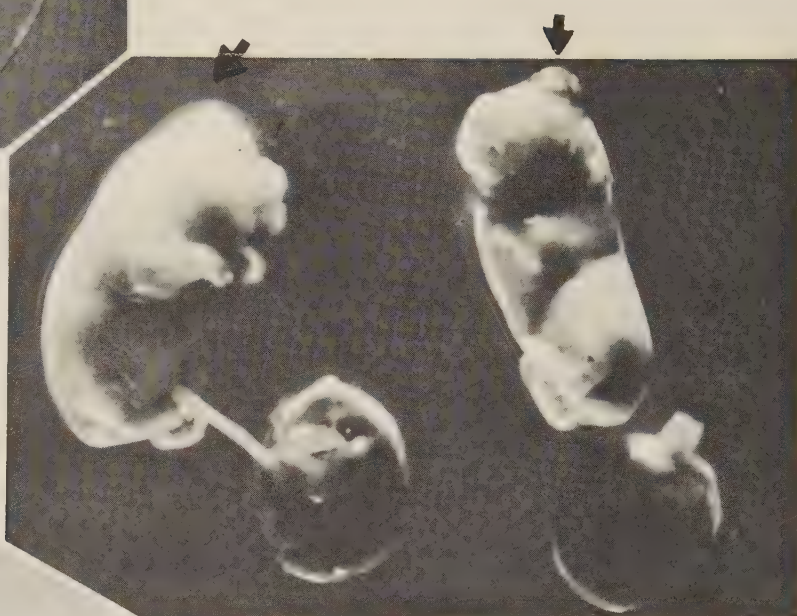


FIGURE 13

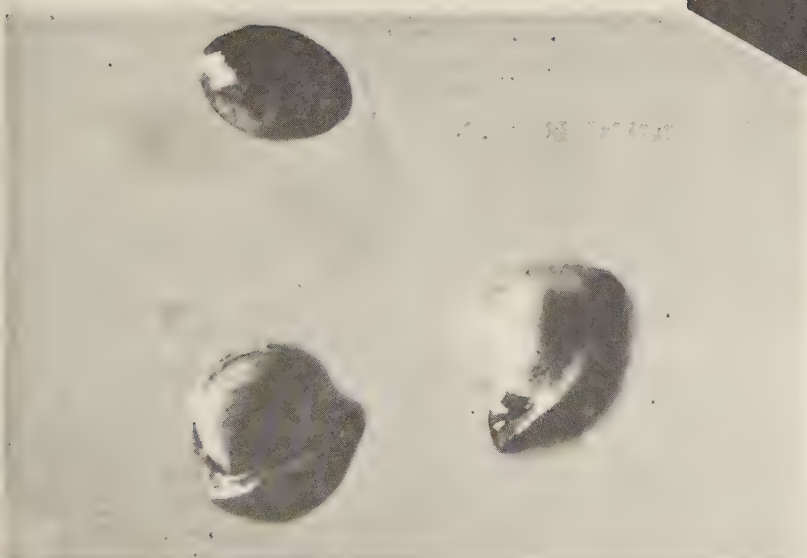


FIGURE 14

faisant saillie par un petit trou crânien médian au niveau de la jonction pariéto-occipitale. Cette hernie paraissait gonflée de liquide ; elle s'est affaissée au bout de quelques heures, soit par résorption soit par dessèchement et n'a pu être photographiée. Le raton n'avait pas d'autres malformations mais était simplement d'une taille médiocre et d'un poids plutôt bas.

Les résorptions foetales devaient être très nombreuses ; nous en avons observé 9 pour les deux rattes axéniques sacrifiées en état de gestation. Les foetus résorbés ressemblent à des boules de la taille d'un pois chiche partagés en deux : $1/3$ du volume représente le placenta, qui prend une forme de soucoupe tenant dans son creux une masse foetale sphérique ($2/3$ du volume), translucide dans son pourtour, opaque dans son milieu (FIGURE 14).

- FIGURE 14 -

Foetus en résorption avec placenta au 15ème jour de la gestation

L'ensemble des malformations que nous groupons sous le terme d'hydrocéphalie (FIGURES 15 et 16) correspond d'abord à une voussure du sommet du crâne dont le volume apparent peut représenter, dans les cas les plus atteints, jusqu'au double du cerveau. Cette voussure est le fait d'un liquide sous pression qui s'évacue brusquement lorsqu'on perce la paroi du crâne très amincie. On se trouve alors en présence d'un cerveau plus ou moins déformé (tel qu'on peut le voir par la FIGURE 17) sans doute en fonction de la quantité de liquide et la durée de pression de celui-ci. Dans le cas le plus atteint, les hémisphères cérébraux sont très réduits en volume de telle sorte que l'aspect général de l'encéphale est celui des vertébrés inférieurs (poissons ou batraciens) ; à noter que ce cerveau tellement réduit n'empêchait pas son propriétaire parvenu au sevrage de manifester quelque vie active (grignoter de la nourriture solide, marcher).

- FIGURE 15 -

Ratons hydrocéphale ou non de la même portée au sevrage

- FIGURE 16 -

Raton hydrocéphale au sevrage, capable de se nourrir, en station digitigrade

- FIGURE 17 -

Cerveaux et globes optiques de ratons à l'hydrocéphalie plus ou moins accusée

L'hydrocéphalie se présente rarement seule et s'accompagne en général d'anophtalmie (absence complète ou réduction à un moignon du globe optique) bilatérale ou unilatérale, de déformation du museau qui s'aplatit et prend une forme en groin de cochon (FIGURES 16 et 18), de déformations osseuses au niveau des pattes (FIGURE 16), mais qui sont peut-être grossies par l'amaigrissement assez important, et enfin de déformations des phanères.

- FIGURE 18 -

Faciès déformé d'un raton hydrocéphale anophtalme

L'atteinte du pelage, avec l'amaigrissement et le retard de croissance semble être chez le rat le signe le plus précoce de l'état déficient. Chez le petit hydrocéphale, mais aussi chez des rats adultes, on constate un poil clairsemé, raide et dressé (horripilé) et frangé de zones de couleur jaune sale.

Contenus et teneurs en cobalamines-B12 chez les rattes et leurs portées .

Après nos essais négatifs de reproduction des rattes axéniques totalement carencées on pourrait s'attendre à un effondrement des réserves chez les mères. Il semble au contraire qu'il existe une résistance à la dépossession des cobalamines des organes riches. Il est vrai que nous n'avons procédé à des études complètes (c'est-à-dire y compris l'analyse de la carcasse) des rattes après gestation que dans des lots de première génération. C'était la seule possibilité de gestation que permettait un régime soit totalement carencé, soit subcarencé (10 µg de vitamine B12/jour).



FIGURE 15



FIGURE 16

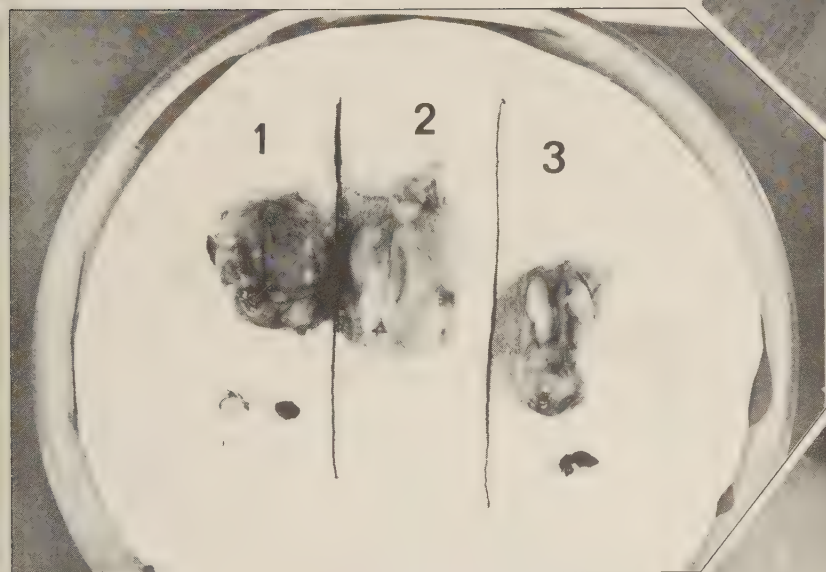


FIGURE 17



FIGURE 18

Cobalamines et vitamine B12 chez les rattes azéniques après gestation

Morts et Généra- tions	Age des rattes (mois)	Date des mises- bas (jours)	Contenus totaux										
			Cobalamines totales (µg)					Vitamine B12(µg)					
			Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	Foie	Reins	Total	Car- casse	Total	
(Régime carencé)													
5 AL-1	5	1	744	1012	<u>1756</u>	5610	<u>7366</u>	230	247	<u>477</u>	2280	<u>2757</u>	
1 AO-1*	3	1	127	252	<u>379</u>	-	-	106	273	<u>379</u>	-	-	
(Régime subcarencé)													
1 AN-1	3	1	87	103	<u>190</u>	3948	<u>4148</u>	69	113	<u>182</u>	306	<u>488</u>	
1 AN-1	3	6	167	192	<u>356</u>	7380	<u>7736</u>	56	168	<u>224</u>	402	<u>626</u>	
1 AN-1	3	10	205	221	<u>326</u>	4076	<u>4402</u>	100	202	<u>302</u>	329	<u>631</u>	
1 AN-1**	3	21	291	204	<u>495</u>	4635	<u>5130</u>	125	177	<u>302</u>	357	<u>659</u>	
(Régime normal)													
ANB ₁₂ -1	3	2	1030	1814	<u>2844</u>	7156	<u>10000</u>	1010	1790	<u>2800</u>	3314	<u>6114</u>	
ANB ₁₂ -1	3	9	1362	1309	<u>2671</u>	8556	<u>11227</u>	1310	1330	<u>2640</u>	3493	<u>6133</u>	
ANB ₁₂ -1	3	16	2178	1164	<u>3342</u>	11990	<u>15332</u>	2440	1231	<u>3671</u>	5095	<u>8766</u>	
ANB ₁₂ -1	3	21	1927	1670	<u>3597</u>	9317	<u>12914</u>	2000	1410	<u>3410</u>	5110	<u>8520</u>	
Teneurs par gramme													
(Régime carencé)													
5 AM-1	5	1	82	438		17		26	107		7		
1 AO-1	3	1	28	175		-		24	190		-		
(Régime subcarencé)													
1 AN-1	3	1	8	43		18		6	66		1,4		
1 AN-1	3	6	20	113		30		5	99		1,6		
1 AN-1	3	10	9	123		16		8	112		1,3		
1 AN-1	3	21	20	89		21		9	77		1,6		
(Régime normal)													
ANB ₁₂ -1	3	2	84	864		25		82	852		12		
ANB ₁₂ -1	3	9	98	569		34		94	578		14		
ANB ₁₂ -1	3	16	121	364		45		135	385		19		
ANB ₁₂ -1	3	21	132	477		36		137	403		20		

* Portée avec 2 exencéphales sur 4 morts-nés

* Portée avec 3 hydrocéphales graves sur 6 rats au sevrage

Contenus et teneurs chez les rattes - Le TABLEAU XXX précise les contenus des foies, reins et carcasses (avec leurs totaux partiels et général) ainsi que les teneurs par grammes des lots :

AL-1 et AO-1 au régime carencé ainsi que AN-1 au régime subcarencé (10 μg de vitamine B₁₂/jour) et ANB₁₂-1 au régime "équilibré" (5000 μg de vitamine B₁₂/ jour).

- TABLEAU XXX -
Cobalamines et vitamine B₁₂ chez les rattes axéniques
après gestation

Nous noterons que le lot AO-1 présente des réserves fortement diminuées. Or, la mortalité néo-natale est de 100 p.100 aussi bien dans le lot AL-1 que AO-1 alors que les réserves sont élevées chez le premier et très diminuées chez le second. L'état des réserves maternelles n'est donc pas un indice suffisant des facultés de reproduction. Comme on ne saurait trop le répéter : la mère satisfait en priorité son propre besoin vitaminique et des troubles de la reproduction peuvent apparaître sans emprunt notable à ses réserves. C'est là une règle quasi générale pour les vitamines du groupe B (GIROUD, 72 JACQUOT 93).

Les rattes AN-1, subcarencées, ont des réserves globales qui ne représentent qu'environ le tiers pour les cobalamines totales (1/7 en considérant seulement l'ensemble Foie + Reins) et un dixième pour la vitamine B₁₂ de celles des rats au régime normal. Il est vrai qu'elles ont gardé en vie leur portée et l'ont allaitée, ce qui a dû entraîner une certaine mobilisation des réserves, malgré l'apport en vitamine B₁₂ du régime. Cependant, pas plus que pour les rattes à flore microbienne ces valeurs ne semblent soumises à l'âge de la portée : on aurait pu penser qu'un allaitement prolongé détermine une diminution plus grande des réserves. Il faut croire que la dose de 10 μg par jour est à la limite du besoin et suffit dans une certaine mesure pour les premières portées, mais non pour les secondes (voir TABLEAU XXIX). Enfin, contrairement aux rattes à flore microbienne (TABLEAU XXVI), les teneurs des carcasses (comprenant toujours le tube digestif ici sans microflore) sont toujours nettement inférieures à celles des témoins.

La ratte AO-1 a mis bas deux exencéphales et cela n'a pas l'air d'influer sur les teneurs en vitamine B12. Il est vrai qu'elle était dans un état déficient, d'un poids corporel très bas (149 g à 3 mois) de même que pour les poids des organes (4,5 g pour le foie, moitié du poids normal et 1,4 g pour les reins). C'est une observation que nous ferons aussi à propos des jeunes rats déficients : il peut y avoir diminution des contenus globaux de vitamine B12 avec une incidence inversée sur les teneurs par gramme, qui sont paradoxalement plus fortes lorsque cet état déficient se manifeste avant tout par une chute pondérale.

D'autre part la ratte AN-1 subcarencée avec une portée de 21 jours (notée ***) dans le TABLEAU XXIX), est celle qui nous a donné les ratons hydrocéphales les plus caractéristiques. Or, cela ne se traduit pas au niveau de ses réserves (TABLEAU XXX). S'il existe un lien étroit entre la carence B12 et l'hydrocéphalie il doit correspondre au défaut de mobilisation des réserves maternelles à un moment où le besoin est très précis pour la différenciation des diverses ébauches embryonnaires.

Dans le TABLEAU XXXI nous avons résumé en les groupant schématiquement les teneurs moyennes en cobalamines et en vitamine B12 de ces différents lots et nous avons repris aux fins de comparaison les teneurs moyennes des rattes à flore microbienne, carencées ou non (TABLEAU XXVI). Dans les lots carencés, les réserves de vitamine B12 sont généralement très diminuées par rapport à celles des témoins, mais elles sont de même ordre de grandeur chez les rattes axéniques et les rattes à flore microbienne. Il y a donc un seuil au-dessous duquel la mobilisation n'est plus possible. La grande différence entre ces deux types de rattes tient surtout à la possibilité pour les normales de puiser dans "les réserves" intestinales.

- TABLEAU XXXI -

Comparaison des teneurs moyennes en cobalamines et vitamine B12
($\mu\text{g/g}$) chez les rattes normales et les rattes axéniques après
gestation

- TABLEAU XXXI -

Comparaison des teneurs moyennes en cobalamines et vitamine B12 ($\mu\text{g/g}$)
chez les rattes normales et les rattes axéniques après gestation

		Rattes normales					
Lots et généra- tions	Nombre	Cobalamines totales			Vitamine B12		
		Foie	Reins	Carcasse	Foie	Reins	Carcasse
(Régime carencé)							
CX-1	5	89	644	46	33	177	6
CX-4	2	23	163	-	11	114	-
CY-2	2	18	134	63	5	115	4
CZ-1	3	32	76	56	10	67	31
(Régime normal) *							
CN-B ₁₂ -1	2	84	899	81	41	371	19
		Rattes axeniques					
(Régime carencé)							
AL-1	5	82	438	17	26	107	7
AO-1	1	28	175	-	24	190	-
(Régime subcarencé)**							
AN-1	4	14	92	21	7	88	1,5
(Régime normal)*							
AN-B ₁₂ -1	4	109	568	35	112	554	16

* Apport "habituel" en vitamine B12 : 5000 $\mu\text{g/j}$

** Apport de 10 μg de vitamine B12 par jour

- TABLEAU XXXII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de rats axéniques nouveaux-nés

Lots et génération	Nombre	Age (jours)	Contenus totaux		Contenus par rat		Teneurs par g	
			Cobala- mines	Vita- mine B12	Cobala- mines	Vita- mine B12	Cobala- mines	Vita- mine B12
(Régime carencé)								
AL-2	8	1	1630	780	204	97	34	16
AL-2	9	1	1730	650	192	72	38	14
AO-2	4 x	1	158	18	40	4,5	9	1,0
AP-2	10	1	289	21	29	2,1	6	0,45
AP-2	7	1	321	19	46	2,8	10	0,60
AN-5	4 xx	(-7)	47	4,3	12	1,1	2,6	0,43
(Régime subcarencé)*								
AN-2	11	1	258	34	23	3	4,2	0,55
AN-2	7	6	230	69	33	10	2,7	0,82
(Régime subcarencé supplémenté)**								
AN-3	12	1	480	23	40	1,9	8	0,39
AN-3	6	1	281	16	47	2,7	10	0,62
AN-3	3	1	178	8,5	59	2,8	11	0,53
AN-3	1	4	71	3,7	71	3,7	18	0,90
AN-4	2	1	59	7,5	29	3,7	10	1,3
AN-4	1	1	66	4,2	66	4,2	14	0,91
AN-4	7	1	203	16	29	2,3	6	0,51
AN-4	4	3	189	15	47	3,8	10	0,80

x Dont 2 exencéphales et 1 méningocèle

xx Dont 2 exencéphales, 7 jours avant la mise-bas

* 10 mg de vitamine B12/jour

** 20 mg de vitamine B12/jour pendant un mois d'accouplement-gestation



Contenus et teneurs chez les ratons à la naissance . Le TABLEAU XXXII indique les valeurs des "cobalamines-B12 " chez les nouveau-nés axéniques dans le cas de régimes totalement carencés, subcarencés (10 μ g de vitamine B12/jour) et subcarencés supplémentés (10 μ g de vitamine B12/jour portés à 20 μ g uniquement pendant un mois d'accouplement-gestation). Dans le cas du régime le plus sévère nous avons vu que la viabilité des portées ne dépasse pas, dans la grande majorité des cas, les 48 heures après la mise-bas. Or, l'état des réserves diffère considérablement d'un lot à l'autre : les contenus totaux de vitamine B12 et les teneurs par gramme sont 5 fois plus élevées dans le lot AL-2 que dans les lots AO-2 ou AP-2.

- TABLEAU XXXII -

Cobalamines et vitamine B12 des portées de rats axéniques nouveau-nés

Il est curieux de noter que ces valeurs sont également très faibles chez les ratons des lots subcarencé et subcarencé supplémenté. Comme les ratons de la lignée AO-2, ceux de la lignée AN-2 sont loin d'avoir épuisé les réserves de l'organisme maternel malgré l'importance de l'emprunt ainsi réalisé (FIGURE 19).

- FIGURE 19 -

Réserves en cobalamines B12 des rattes axéniques et de leurs portées, à divers régimes.

En bref, il ne semble exister aucune relation entre le contenu en vitamine B12 et la viabilité de la portée : dans la lignée AL-2 la mortalité néo-natale est de 100 p.100 alors que les contenus en vitamine B12 sont élevés et presque équivalents à ceux des ratons témoins au régime équilibré ; à l'inverse la mortinatalité est relativement réduite chez les ratons du lot AN-2 supplémenté qui sont pauvres en cyanocobalamine. L'apport de vitamine B12 à la mère permet de sauvegarder la gestation et d'assurer la viabilité des portées sans modifier pour autant le contenu vitaminique des nouveau-nés. Les malformations précoces et le nombre de petits non viables

semblent donc dépendre de l'absence d'un minimum de vitamine B12 dans le régime maternel, minimum destiné à satisfaire le besoin "dynamique " en ce facteur (*).

Contenus et teneurs chez les portées de jeunes rats avant et après sevrage . La plupart des résultats d'analyses présentées dans le TABLEAU XXXIII se réfèrent à des ratons axéniques en période d'allaitement jusqu'au sevrage pour lesquels nous avons ~~ajouté~~ ajouté les réserves en cobalamines et en vitamine B12 des foies et des reins ~~ajoutés~~ aux contenus des carcasses. On y trouvera également quelques valeurs relatives aux teneurs par gramme chez des jeunes rats mâles ou femelles un peu plus âgés placés au régime supplémen-té, ce qui permet de comparer la période d'allaitement avec le début du sevrage.

- TABLEAU XXXIII -
Cobalamines et vitamine B12 des portées de jeunes rats
axéniques

Le régime carencé ne figure pas dans ce tableau puisque la viabilité qu'il permet ne dépasse généralement pas 48heures. Nous examinerons donc uniquement les effets des régimes subcarencés et du régime équilibré sur les réserves. Les valeurs des contenus totaux sont présentées aussi dans la FIGURE 19 qui permet de constater combien les réserves des portées restent faibles malgré l'apport alimentaire. Elles représentent le quart de la vitamine B12 de la mère pour la portée de 10 jours, un peu moins de la moitié pour celle ayant atteint le sevrage (voir aussi le TABLEAU XXX pour les valeurs chiffrées des rattes subcarencées AN-1 dont on analyse ici les portées de 10 et 21 jours). Or cette portée au sevrage était composée de 3 ratons et de 3 hydrocéphales. Il était donc intéressant de donner en détail les contenus moyens et les teneurs moyennes des ratons normaux et des hydrocéphales dont l'un était dans un état de grande déficience. Nous avons trouvé des contenus de plus en plus bas aus-

(*)- On est en droit de se demander à la lumière de l'ensemble des données sur les réserves, si l'importante mortalité néo-natale des portées de la lère génération aux contenus élevés en vitamine ne devrait pas, en définitive, être attribuée au déséquilibre de la mère ne supportant pas un tel prélèvement et dévorant ses petits bien con-formés.

Cobalamines et vitamine B12 des portées de jeunes rats axéniques

Lots et générations	Nombre	Age (jours)	Contenus totaux									
			Cobalamines totales					Vitamine B12				
			Foie	Reins	Total	Carcasse	Total	Foie	Reins	Total	Carcasse	Total
(Régime subcarencé)*												
AN-2	3	10	49	40	<u>89</u>	512	<u>601</u>	28	35	<u>63</u>	112	<u>175</u>
AN-2	6 ⁺	21	169	88	<u>257</u>	1950	<u>2207</u>	29	31	<u>80</u>	201	<u>281</u>
dont moyennes des contenus par rat :												
(rats normaux	$\bar{3}$		34	18	<u>52</u>	380	<u>432</u>	5,4	10,4	<u>15,8</u>	36	<u>52</u>)
(hydro- céphales	$\bar{3}$		23	12	<u>35</u>	270	<u>305</u>	4,2	6,7	<u>10,9</u>	31	<u>42</u>)
(hydro- céphale: le plus atteint	(1)		(14)	(7)	(21)	(218)	(239)	(2,8)	(3,2)	(6,0)	(28)	(34)
(Régime équilibré)												
AB ₁₂ -N2	8	9	1002	807	<u>1809</u>	1976	<u>3785</u>	1008	750	<u>1758</u>	1149	<u>2907</u>
AB ₁₂ -N2	9	21	2317	4176	<u>6493</u>	9675	<u>16168</u>	1818	3816	<u>5634</u>	5058	<u>10692</u>
Teneurs par gramme												
(Régime subcarencé)*												
AN-2	3	10	19	40		7,5		11	3,5		1,6	
AN-2	6 ⁺	21	13	24		7,5		2,2	13		0,77	
ddont moyennes :												
(rats normaux	$\bar{3}$		13	25		7,7		2,2	15		0,72)	
(hydro- céphales	$\bar{3}$		13	23		7,2		2,2	12		0,84)	
(hydro- céphale: le plus atteint	(1)		(13)	(8)		(7,4)		(2,5)	(8)		(0,95))	
(Régime subcarencé supplémenté)**												
AN-3	3 0	40	17	38		-		1,8	42		-	
AN-3	⁺⁺ 9 0	50	16	55		-		2,6	32		-	
AN-3	3 0	40	17	53		-		3,5	50		-	
AN-3	21 0	50	16	68		-		3,4	35		-	
(Régime équilibré)												
AB ₁₂ -N-2	8	9	167	351		11,5		168	326		6,7	
AB ₁₂ -N-2	9	21	99	580		18,5		77	544		9,7	

* 10 mg de vitamine B12/jour

+ dont 3 hydrocéphales

** 20 mg de vitamine B12/jour pendant un mois d'accouplement-gestation

++ début d'hydrocéphalie très nette chez 6 d'entr'eux s'estompant au sevrage

si bien pour les cobalamines que pour la vitamine B12 en rapport avec l'aspect de plus grande déficience des animaux. Peut-on en déduire qu'il existe une correspondance entre les déficiences ou malformations visibles et la baisse des réserves en vitamine B12 ?

Cette hypothèse est infirmée par la comparaison des teneurs par gramme qui sont sensiblement les mêmes (sauf pour les reins du raton le plus déficient). Les écarts entre les contenus totaux proviennent essentiellement d'une baisse importante du poids des organes et de la carcasse :

	<u>Foie</u>	<u>Reins</u>	<u>Carcasse</u>
Poids moyen en g des rats bien conformés	2,5	0,7	49,3
Poids moyen en g des hydrocéphales.	1,7	0,6	37,3
Poids de l'hydrocéphale le plus atteint	1,1	0,4	29,5

Ces différences pondérales expliquent à elles seules la baisse des réserves en cobalamines et vitamine B12 chez les hydrocéphales et ne permettent pas de savoir si l'état déficient est à l'origine de la baisse des réserves ou n'en est que le résultat. Certes, la baisse des teneurs des reins (TABLEAU XXXIII), notamment chez l'hydrocéphale le plus gravement atteint, est digne de remarque, puisque ces organes nous sont apparus comme les sites de réserve principaux dès la fin de l'allaitement. D'un autre côté, ne pourrait-on dire que cette baisse de la réserve en vitamine est secondaire à l'amaigrissement liée à un catabolisme protéique accru ? Nous éviterons de conclure sur ce point qui demanderait d'autres recherches.

En ce qui concerne les teneurs par gramme des jeunes rats au régime supplémenté nous avons peu de chose à dire si ce n'est que les foies gardent des teneurs très basses et que les reins présentent encore une fois la plus grande tendance à l'accumulation. Cette tendance est encore plus nette chez les jeunes rats bénéficiant d'un régime "équilibré".

La comparaison que l'on peut faire entre les teneurs des portées de rattes normales et de rattes axéniques ainsi que les teneurs des ratons des deux types au sevrage manque évidemment de rigueur puisque nous sommes en présence de régimes et de conditions d'élevage assez dissemblables. Cependant une récapitulation dans un tableau d'ensemble de ces teneurs, permet de se faire une idée globale de l'état des réserves des ratons des deux types.

- TABLEAU XXXIV -

Comparaison des teneurs moyennes en cobalamines et vitamine B12 (µg/g) chez les portées et les jeunes rats normaux et axéniques

(ensemble des ratons) Le TABLEAU XXXIV résume les teneurs par gramme des portées d'une part, des organes et des carcasses des jeunes rats de l'autre, résultats que nous avons condensés d'après les TABLEAUX XXVII et XXVIII pour les normaux et d'après les TABLEAUX XXXII et XXXIII pour les axéniques. Que pouvons-nous tirer de cette confrontation ? Pour les ratons à la naissance les teneurs des portées sont assez comparables quel que soit le type de rat ou le régime ; elles semblent différer surtout suivant les lignées (comparer les lots de deuxième génération entr'eux). Pour les ratons à l'allaitement, par contre, les teneurs à partir du 14ème jour après la naissance marquent une mise en réserve nettement plus grande chez les ratons normaux par rapport aux ratons axéniques et portant sur les deux organes considérés (reins et foie) et aussi, de façon très générale, sur la carcasse (à l'exception pour cette dernière, du lot CY-3). Cela est valable aussi bien pour les cobalamines totales que pour la vitamine B12. Pour la période après le sevrage nous ne retiendrons que les valeurs du foie et des reins des ratons axéniques dont les mères, soumises préalablement au régime subcarencé ont reçu durant la gestation 20 µg de vitamine B12 par jour (régime subcarencé supplémenté). Les teneurs en cobalamines de ces jeunes rats restent au même niveau que celles de leurs congénères axéniques avant le sevrage ; elles sont donc basses par rapport aux teneurs en cobalamines des ratons normaux. Il en est de même pour les teneurs en vitamine B12 du foie, par contre les mises en réserve de vitamine B12 dans les

- TABLEAU XXXIV -

Comparaison des teneurs moyennes en cobalamines et vitamine B12 (µg/g)
chez les portées et les jeunes rats normaux et axéniques

Portées normales					Portées axéniques				
Lots et générations	Nombre	Jours	Cobalamines	Vitamine B12	Lots et générations	Nombre	Jours	Cobalamines	Vitamine B12
(régime carencé)					(régime carencé)				
EX-2	25	1	30	12	AL-2	17	1	36	15
CZ-2	6	1	19	13	AO-2	4	1	9	1,0
EY-3	14	1	6,5	0,7	AP-2	17	1	8	0,51
EX-4	5	1	7	1,6	(régime subcarencé)				
EX-5	8	1	15	0,7	AN-2	11	1	4,2	0,55
					AN-2	7	6	2,7	0,82
					(régime subcarencé supplémenté)				
					AN-3	21	1	9	0,48
					AN-3	1	4	18	0,90
					AN-4	10	1	8	0,71
					AN-4	4	3	10	0,80
(régime équilibré)					(régime équilibré)				
AB ₁₂ -N-2	2	1	42	15	AB ₁₂ -N-2	9	2	28	22

Ratons normaux								
Lots et générations	Nombre	Jours	Foie	Cobalamines		Foie	Vitamine B12	
				Reins	Carcasse		Reins	Carcasse
(régime carencé)								
CZ-2	16	9	59	43	29	12	9,5	14
CX-2	5	21	48	267	58	19	115	5
EY-3	2	14	39	114	7	16	50	0,6
CX-5	8	21	25	80	-	7	42	-
CX-5	6	30	43	134	50	17	57	4
(régime équilibré)								
CZ-2	7	9	135	1407	61	89	818	53
CZ-2	7	16	163	2400	33	29	2105	8

Ratons axéniques								
(régime subcarencé)								
AN-2	3	10	19	40	7,5	11	35	1,6
AN-2(n)*	3	21	13	25	7,7	2,2	15	0,72
AN-2(h)*	3	21	13	23	7,2	2,2	12	0,84
(régime subcarencé supplémenté)								
AN-3	3 0	40	17	38	-	1,8	42	-
AN-3	9 0	50	16	55	-	2,6	32	-
AN-3	3 0	40	17	53	-	3,5	50	-
AN-3	21 0	50	16	68	-	3,4	35	-
(régime équilibré)								
AB ₁₂ -N-2	8	9	167	351	11,5	168	326	6,7
AB ₁₂ -N-2	9	21	99	580	18,5	77	544	9,7

* (n) ratons non malformés; (h) ratons hydrocéphales de la même portée

reins des ratons axéniques tendent à rejoindre les niveaux des ratons normaux au régime totalement carencé mais bénéficiant des synthèses intestinales de leur mère.

B)- ETUDE DU RAT EN CROISSANCE -

Nous allons reprendre l'étude des différents lots, survivant aux conditions les plus sévères de l'élevage axénique, dans leur croissance jusqu'à l'âge adulte. Nous analyserons de façon concomitante les effets des régimes plus ou moins carencés en vitamine B12.

Protocole expérimental -

Aux remarques que nous faisons, à propos des rats normaux à microflore, sur les difficultés de comparer des lots qui ne sont pas de même importance, issus de gestations réalisées à des époques et dans des conditions diverses, s'ajoutent ici des impératifs d'élevage encore plus stricts limitant le nombre de rats étudiés au même moment. Ces animaux ont été, en outre, soumis à des régimes plus ou moins carencés, voire variables pour le même lot s'il s'avérait nécessaire d'assurer la survie ou, au contraire, d'obtenir un épuisement des réserves après une certaine période à un régime moins strict. L'éventail des conditions est, ici, trop grand pour ne pas avoir des résultats d'un intérêt inégal, c'est pourquoi nous rapporterons seulement en détail les données les plus complètes nous contentant de regrouper les données fragmentaires ou de les résumer.

Contrôle de la carence en cours d'expérience -

Croissance pondérale - Nous n'avons retenu que la lignée AN, dont l'élevage a été poursuivi pendant 4 générations, qui présente des exemples de croissance des portées maintenues au régime subcarencé et dont les mères étaient soit au même régime (lots AN-1 et AN-2), soit à un régime de 20 μ g de vitamine B12 par jour pendant un mois d'accouplement-gestation (lots AN-3, AN-4). Comme terme de comparaison

on peut se référer aux résultats précédemment exposés, concernant la croissance de la première génération d'animaux totalement carencés en vitamine B12 (Chapitre II, mâles de la lignée AL-1 désignés sous forme simplifiée lots A et A-B12). Enfin la lignée AN est celle qui nous a présenté des exemples de rats hydrocéphales, seule malformation observée compatible avec une certaine croissance.

- FIGURE 20 -

Croissance moyenne des rats mâles axéniques de plusieurs générations

Nous voyons dans la FIGURE 20 les courbes de croissance de ces différents lots. Malgré la carence totale du régime les rats AL-1 présentent une augmentation très régulière de poids. Le régime subcarencé permet au lot AN-1 d'avoir encore une meilleure croissance, tout au moins durant les trois premiers mois. Mais, dans la même lignée, déjà la première portée de la deuxième génération (AN-21)(*) comporte trois cas d'hydrocéphalie ; la courbe de croissance du lot ne concerne que les rats non atteints, les autres ont été sacrifiés précocement aux fins d'analyse du fait de leur faible chance de survie. Cependant dès la première génération on constate des écarts considérables de poids. Nous n'avons pas d'autres données concernant ce même régime subcarencé car la mortalité de 100 p.100 du lot AN-2 et celle très grande du lot AN-31 (TABLEAU XXIX) a conduit à donner un supplément de vitamine B12 aux rattees gestantes (au total 20 mg par jour) : cela a permis d'élever le lot AN-32 qui présente néanmoins la courbe de croissance la plus basse. Les gains de poids plus élevés des portées ultérieures (AN-33, 34 et 35) sont, à notre avis, à mettre sur le compte du doublement de la dose de vitamine dans la ration alimentaire de la mère qui bénéficie au total, pendant un mois environ, d'un apport de 600 mg de vitamine B12. Pourtant c'est parmi ces lots à croissance améliorée que l'on trouve à nouveau un certain nombre d'hydrocéphales (Lots AN-34 et 35). L'obtention d'une meilleure croissance se réalise encore pour la 1ère portée de la 4ème génération (AN-41) mais non pour la 2ème portée.

(*) AN-21. Le premier chiffre désigne la génération, le deuxième la portée.

Croissance moyenne des rats σ axéniques de plusieurs générations

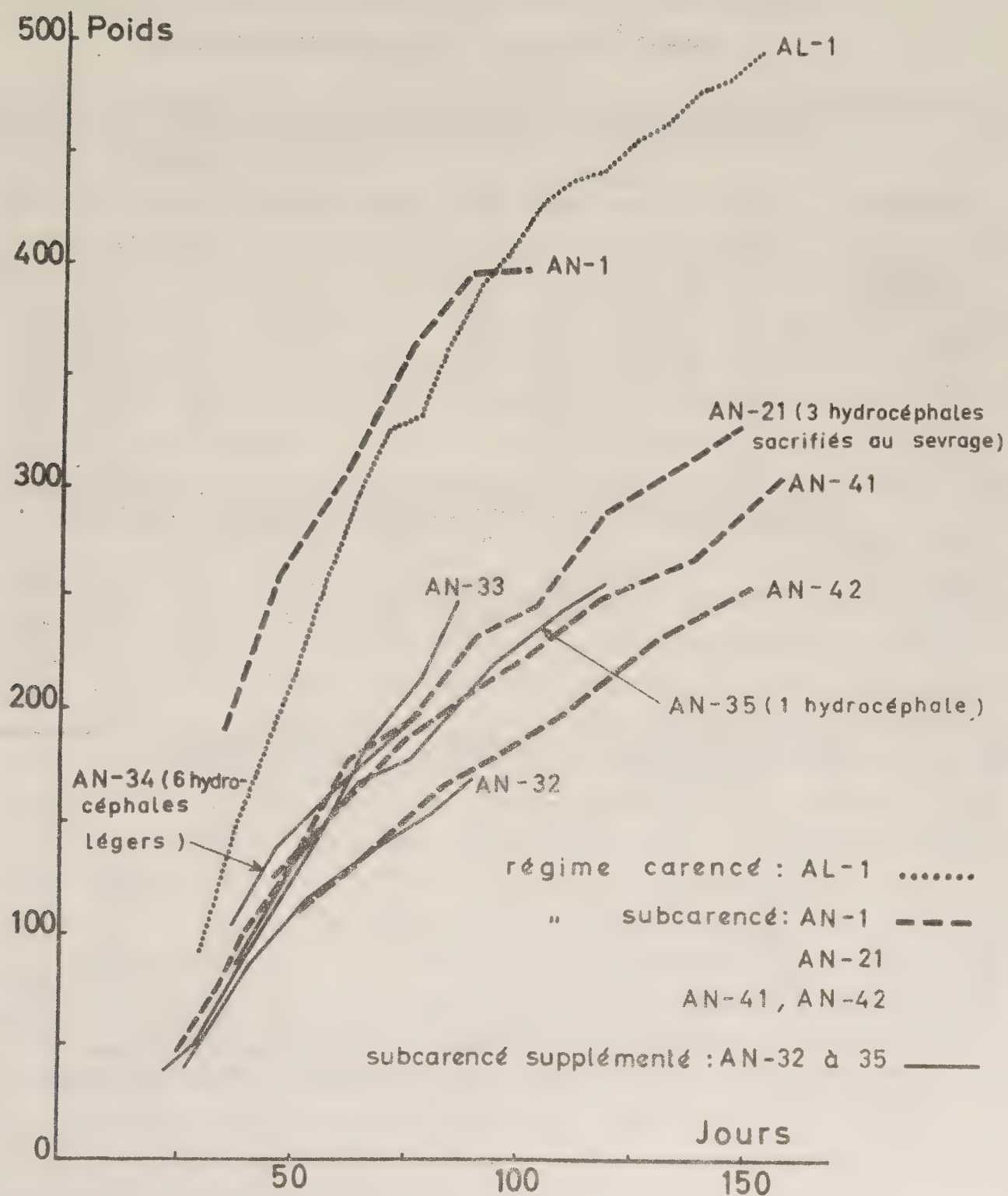


Figure 20

- TABLEAU XXXV -

Gain de poids moyen par rat et par jour des rats axéniques mâles aux régimes
carencé^(x), subcarencé^(xx) et subcarencé supplémenté^(xxx)

Régimes	Lots et générations *								
	(nombre de rats par lot)								
	(x)	(xx)		(xxx)					
	AL-1 (11)	AN-1 (5)	AN-21 (11)	AN-32 (4)	AN-33 (19)	AN-34 (17)	AN-35 (7)	AN-41 (3)	AN-42 (2)
<u>PERIODE</u>									
4ème semaine	4,3	5,7	3,0	3,4	2,8	3,9	3,6	-	-
2ème mois	4,0	4,4	3,6	2,8	3,6	2,1	2,5	2,1	1,7
3ème "	1,9	2,2	2,0	1,5	3,2	1,8	1,8	1,8	1,6
4ème "	1,5		1,6				1,4	1,5	1,2
5ème "	0,5		1,6					1,3	1,4
<u>Différences de gains de poids par rapport à la première génération</u>									
4ème semaine		-	-2,7	-2,3	-2,9	-1,8	-2,1	-	-
2ème mois		-	-0,8	-1,6	-2,3	-2,3	-1,9	-2,3	-2,7
3ème "		-	-0,2	-0,7	-0,4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,6
4ème "	-		+0,1				-0,1	0	-0,3
5ème "	-		+1,1					+0,8	+0,9
<u>Ecart de poids moyen par rapport à la première génération</u>									
AGE	Poids en g		Diminution en %						
1 mois	91	190	-61	-79	-73	-60	-71	-	-
2 "	272	305	-42	-59	-46	-46	-49	-50	-59
3 "	385	396	-41	-57	-38	-47	-46	-48	-57
4 "	443		-37				-42	-43	-53
5 "	486		-33					-40	-48

(xxx) Il s'agit d'une supplémentation intéressant seulement leur vie foetale

(*) Le deuxième chiffre d'un lot désigne la portée (ex: AN-21 deuxième génération, première portée)

La suppression du supplément dans le lot AN-41 conduit à des avortements ou des résorptions foetales, des anomalies embryonnaires (ex-encéphalie) et une mortinatalité à nouveau très élevée.

- TABLEAU XXXV -

Gain de poids moyen par rat et par jour des rats axéniques mâles au régime carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Les gains de poids moyen par jour de ces divers lots sont transcrits dans le TABLEAU XXXV. En raison du sacrifice relativement précoce du lot AN-1 qui tronque sa courbe de croissance au 3ème mois les générations et portées ultérieures de ce lot AN ont été comparées avec les valeurs correspondantes du lot AL-1 au même âge (4ème et 5ème mois). Nous retrouvons le phénomène précédemment signalé à propos des rats normaux au régime totalement carencé (TABLEAU XII) : les écarts de poids entre la 1ère génération et les générations successives sont beaucoup plus accentués lors des premiers mois de la vie des ratons que par la suite. On observe en quelque sorte une reprise de croissance aux 4ème-5ème mois. Pour chaque lot les différences s'estompent progressivement et de négatives deviennent positives. Nous noterons que chez les rats normaux à microflore autochtone cette inversion de signe dans les écarts de gain de poids par rapport à la 1ère génération se fait plus tôt à partir du 3ème mois (TABLEAU XII).

Les écarts de poids moyen par rapport à la première génération témoignent également des effets de la carence. Malgré les suppléments alloués aux mères la diminution de poids, considérable lors du premier mois (60 à 79 p.100) est encore importante au 4ème mois (37 à 53 p.100). La comparaison par rapport aux écarts trouvés chez les rats normaux carencés (TABLEAU XII) est toujours au profit de ceux-ci : 19 à 52 p.100 pour le premier mois et 8 à 25 p.100 au 4ème. En somme, les écarts de poids diminuent en moyenne de 70 p.100 (1er mois) à 45 p.100 (4ème mois) pour les rats axéniques tandis que pour les normaux ils diminuent de 35 p.100 à 17 p.100.

- FIGURE 21 -

Comparaison des croissances extrêmes chez les lignées axéniques et normales

La figure 21 résume assez bien ces différences de croissance des rats axéniques et de rats normaux suivant divers régimes plus ou moins carencés et diverses générations : nous avons retracé à la même échelle les courbes de croissance extrêmes pour les rats axéniques (celle des lots AL-1 et AN-1 correspondent au maximum et celles des lots AN-32 et AN-42 au minimum) et, pour les rats normaux (zone hachurée entre les courbes de croissance CX-1 et CX-4). Les différences entre les croissances des rats axéniques englobent très largement les différences observées chez les rats à flore microbienne. Le minimum des gains de poids est assez voisin chez les deux types de rats. Mais il faut tenir compte que le rat axénique est nettement plus lourd que son homologue à flore microbienne. De ce fait les lots déficients axéniques sont en réalité beaucoup plus touchés. Et cette croissance déficiente, à la limite de la léthalité de la lignée, n'est obtenue que grâce à un certain apport quotidien en vitamine B12. Nous voyons encore une fois les effets de la microflore intestinale capable de compenser un régime qui est, lui, totalement carencé.

Nous pouvons conclure, sur le plan de la croissance des rats axéniques, à un phénomène analogue à celui observé chez les rats normaux. Lorsqu'il y a un minimum d'apport de vitamine B12 la croissance bien que ralentie, se poursuit avec l'âge et on peut estimer qu'elle atteint les performances du rat placé au régime normal au prix d'un retard très important dans le temps. Nous avons des exemples de rats axéniques au régime subcarencé, donc à croissance ralentie du fait des succès dans les gestations et allaitements, parvenant à un poids de 500 g à 14 mois (AN-2) ou de 400 g à 12 mois (AN-41). Par contre le phénomène de la formation de réserves utilisable d'une génération sur l'autre, et se traduisant sur les courbes de croissance, est évidemment soumis à l'arbitraire de

Comparaison des croissances extrêmes chez les
lignées axéniques et normales .

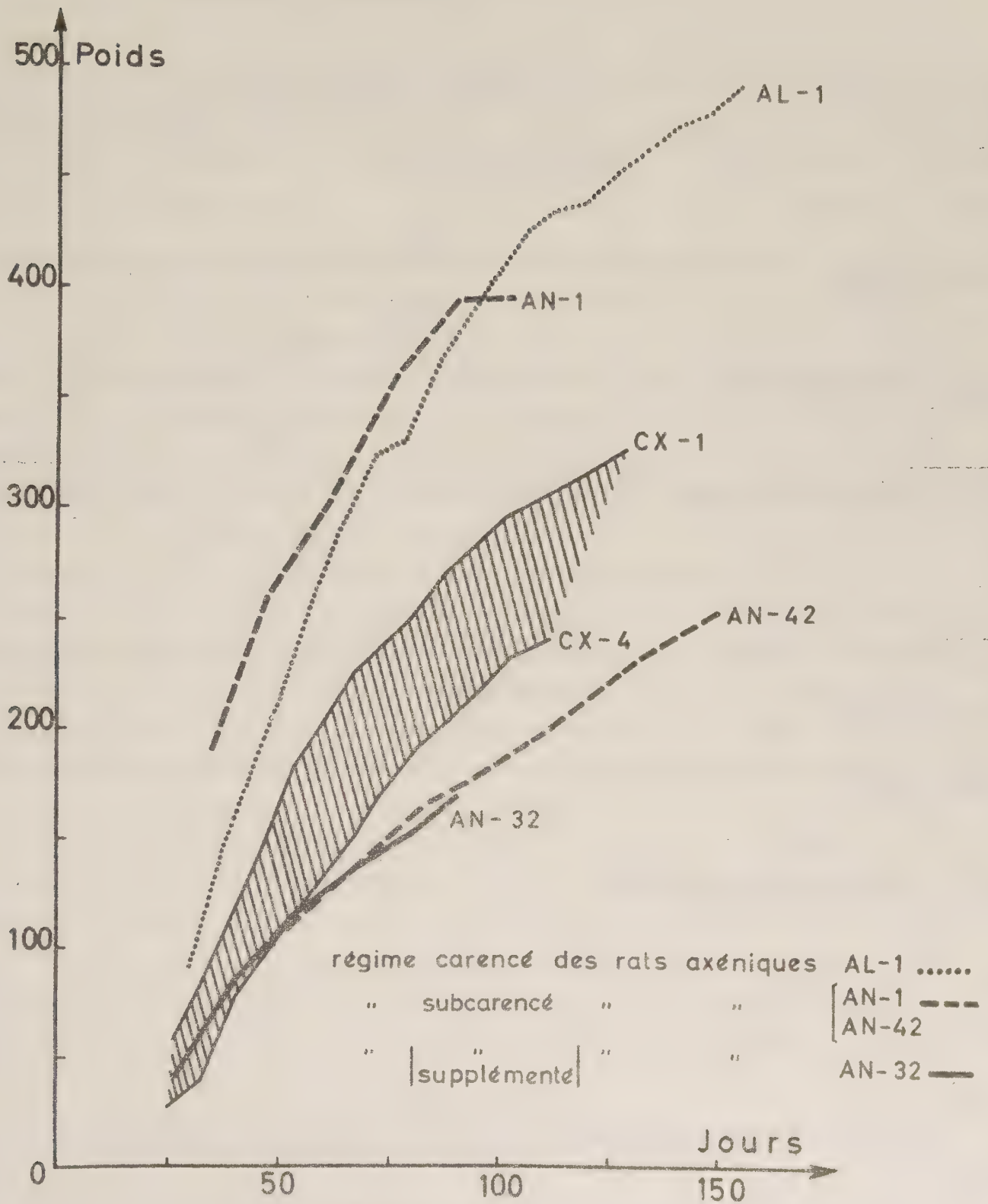


Figure 21

la dose de vitamine B12 choisie comme supplément au régime. Il semble qu'avec 20 μg par jour nous soyons véritablement à la limite puisque nous assistons à un certain redressement des courbes d'une portée sur l'autre (AN-32 à AN-35) mais non d'une génération sur l'autre (AN-3 à AN-4) (FIGURE 20). Il y a ici des impondérables portant sur les capacités d'accumulation vitaminique des rats des divers lots et les prélèvements que représentent les générations successives.

Signes hématologiques -

Numérations globulaires. L'étude du sang a été réalisée au moment du sacrifice des rats axéniques. Le prélèvement en cours de croissance nécessitait une installation, et des préparatifs, à l'intérieur des isolateurs qui ne pouvait se justifier que si nous avions des raisons de soupçonner une anémie accompagnant un état déficient caractérisé. Or, les résultats obtenus lors de sacrifices de rats manifestement très atteints ne permettaient aucune conclusion en ce sens, bien au contraire. Par ailleurs pour des raisons développées à propos des rats à microflore, nous avons abandonné la prise de sang à la queue (car nous risquions de ne pas en obtenir un volume suffisant chez les sujets en mauvais état et aux vaisseaux collabés) pour la ponction cardiaque après ouverture de la paroi abdomino-thoracique. Nous avons donc obtenu dans un premier stade des résultats concernant le sang périphérique, puis des résultats concernant le sang central qui sont, en général, inférieurs de plus d'un million d'hématies par mm^3 aux précédents. Dans l'examen des TABLEAUX XXXVI et XXXVII il faudra tenir compte de cette différence considérable entre le sang pris à la queue et le sang ponctionné au coeur. Cependant même en faisant les corrections nécessaires pour comparer les deux sortes de valeurs nous pourrions voir qu'on ne peut tirer aucun argument tendant à affirmer l'existence d'une anémie.

- TABLEAU XXXVI -

Numération globulaire moyenne des rats mâles axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et supplémenté

Le TABLEAU XXXVI présente les numérations globulaires des rats mâles aux divers régimes. Il est aisé de constater que le régi-

me carencé n'apporte aucune différence par rapport au régime normal, en particulier à la première génération ; il est vrai que nous n'avons pu induire une diminution suffisante des réserves d'une génération sur l'autre puisque à la sévérité du régime répondait la mortalité néo-natale et que nous avons été obligés d'apporter une supplémentation de vitamine B12 au régime. Cependant aux courbes de croissance basses (Lots AN-32 et AN-42) ne correspond aucune déficience hématologique, signe qui ne se retrouve pas non plus chez les lots de rats comprenant des hydrocéphales. Nous avons remarqué au contraire une tendance à l'augmentation du nombre d'hématies chez les rats qui, individuellement, étaient de poids le plus faible et présentaient des signes de déficience ; les animaux du lot AO-1 se trouvent également dans ce cas. Enfin on peut noter que, abstraction faite du régime, les valeurs du 2ème mois sont les plus basses, ce que nous avions déjà constaté chez les rats normaux.

- TABLEAU XXXVII -

Numération globulaire moyenne des rats femelles axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et supplémenté

L'analyse du TABLEAU XXXVII consacré aux numérations globulaires chez les femelles axéniques confirme cette variation à ceci près qu'on retrouve quelques valeurs un peu basses vers le 12ème mois. Ici aussi nous ne constatons aucune tendance à l'anémie mais parfois la tendance contraire. Cette curieuse augmentation du nombre d'hématies (polyglobulie) chez un certain nombre de rats de poids et d'état déficient méritait d'être signalée. Cependant elle n'a pas un caractère général et on ne saurait établir une corrélation inverse entre le poids corporel et le nombre d'hématies, car les rats de poids le plus fort présentaient aussi une concentration en hématies élevée . Nous verrons dans quelle mesure l'étude de l'hématocrite permet de préciser tant soit peu ce phénomène.

Hématocrites - La valeur moyenne de l'hématocrite s'établit pour les rats mâles à 51 p.100 (moyenne de 45 déterminations, valeurs ex-

- TABLEAU XXXVII -

Numération globulaire moyenne des rats femelles axéniques aux régimes équilibré
carencé, subcarencé et supplémenté

Hématies en millions par mm³
(nombre de rats du lot)

Lots de rats et générations	Age en mois									
	2	3	4	5	6	7...	9...	12...	14	15
(Régime carencé)	(<u>sang périphérique</u>)									
AL-1				9,6 (5)						
AO-1						10,7 (4)				
(Régime subcarencé)										
AN-1						11,7 (3)				
(Régime subcarencé supplémenté)										
AN-2							8,4 (2)			
AN-32			9,4 (3)							
AN-33		9,5 (3)								
(Régime équilibré)	(<u>sang central</u>)									
AB ₁₂ -P-1		9,3 (6)								
(Régime carencé)										
AP-1							8,8 (7)			
AP-2					8,3 (2)					
(Régime subcarencé supplémenté)										
AN-2								8,5 (7)		
AN-32	8,7 (3)									
AN-33	7,8 (9)	9,0 (4)								7,6 (3)
AN-34	7,6 (12)	8,5 (6)								
AN-35		9,1 (1)	8,9 (10)							
AN-41							7,9 (7)			
AN-42							9,0 (3)			

trêmes 47 - 54) tandis que pour les femelles elle est de 49 p.100 (moyenne de 56 déterminations, valeurs extrêmes 44 - 52). Les écarts entre ces valeurs bien qu'un peu plus dispersés que chez les rats normaux, n'atteignent pas l'amplitude des variations des numérations globulaires. La relative constance de l'hématocrite indique déjà qu'il ne s'agit pas d'une hémococoncentration, c'est pourquoi l'augmentation du nombre des hématies/mm³ doit correspondre à une diminution du volume globulaire. Le volume plus réduit des globules rouges se retrouve dans les lots AN-21, AN-35 et AN-42 (et aussi bien pour les mâles que pour les femelles); les deux premiers comprennent des hydrocéphales, le troisième présente la courbe de croissance la plus basse. Il faut préciser ici que la microcytose, quoique moins fréquente que la macrocytose, a été aussi signalée parmi les signes de l'anémie de BIERMER. Cependant les résultats obtenus sont insuffisants pour pouvoir affirmer que la microcytose est, en l'absence d'anémie, une des formes de réaction des rats à la carence en vitamine B12. En fait rappelons que cette étude n'a pu être menée, dans la grande majorité des cas, que sur des rats en subcarence.

La moyenne d'ensemble pour les volumes globulaires a été de 57 à 59 μ^3 (microns-cubes) respectivement pour les mâles et les femelles axéniques alors que les valeurs correspondantes pour les rats normaux carencés étaient 62 et 61 μ^3 . Peut-être les valeurs moins élevées chez les rats axéniques sont-elles à mettre sur le compte d'une moins bonne adaptation à la carence.

Frottis sanguins - Pas plus que pour les rats normaux maintenus au régime carencé depuis plusieurs générations, l'examen des lames provenant des rats axéniques n'a fait ressortir aucun des éléments signalés dans l'anémie de BIERMER chez l'homme.

*
* *

Si modification légère il y a dans les éléments figurés du sang de rat en avitaminose B12, il est clair qu'il ne s'agit pas du tout d'un blocage de la multiplication cellulaire de la

lignée sanguine. Les augmentations du nombre d'hématies par mm³ constatées, chez les rats les plus déficients et de poids le plus bas, ne sont pas à mettre sur le compte d'un état de choc avec perte de plasma (et donc d'une hémococoncentration), conclusion qui ressort de la relative constance des hématocrites. Nous nous trouvons dans quelques cas en présence d'une microcytose. Cependant nous n'avons pas suffisamment de données systématiques pour généraliser cette constatation . Nous pensons, au contraire, que la lignée sanguine du rat axénique ou du rat normal (du moins à partir du sevrage) résiste très bien à la carence en vitamine B12, du fait d'une sorte d'adaptation par ralentissement de la croissance, qui entraîne une diminution de volume de l'ensemble de la masse sanguine.

Réserves en cobalamines et vitamine B12 -

Contenus des reins et du foie - Nous analyserons tout d'abord l'ensemble des variations des réserves des rats axéniques, ^{adultes} plus ou moins carencés, tous lots réunis suivant les régimes, par rapport aux rats témoins au régime équilibre.

- TABLEAU XXXVIII -

Variations des réserves moyennes (contenus totaux) en vitamine B12 et en cobalamines totales des reins et du foie des rats axéniques ^{adultes}
aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Le TABLEAU XXXVIII présente ces données d'ensemble qu'il convient de comparer aux valeurs concernant les rats normaux à microflore (TABLEAU XIX). Les reins possèdent toujours des contenus en vitamine B12 supérieurs à ceux du foie; mais la différence entre les reins et le foie considérable avec le régime équilibré, s'amenuise lors de la carence B12 totale. Les réserves de cobalamines totales obéissent à la même répartition. Ces résultats ne diffèrent pas pour l'essentiel de ce que nous avons observé chez les rats mâles à microflore. Que peut-on en déduire ? L'accumulation de vitamine B12 se produit dans les reins qu'il s'agisse de rats au régime normal ou de rats recevant un apport limité en vitamine B12. L'état carenciel

- TABLEAU XXXVIII -

Variations des réserves moyennes (contenus totaux) en vitamine B12 et en cobalamines totales des reins et du foie des rats ^{adultes} axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Organes	Vitamine B12 en μg							
	Régimes : Rats mâles				Régimes : Rats femelles			
	équilibré	carencé	subcarencé	subcarencé supplémenté	équilibré	carencé	subcarencé	subcarencé supplémenté
Nombre de rats	(8)	(30)	(7)	(59)	(11)	(14)	(7)	(72)
Reins	3315 (65%)	167 (58%)	228 (84%)	91 (70%)	2665 (57%)	203 (60%)	181 (70%)	94 (69%)
Foie	1780 (35%)	119 (42%)	44 (16%)	38 (30%)	2019 (43%)	135 (40%)	77 (30%)	42 (42%)
Reins + Foie	5095	286	272	129	4684	338	258	136
Diminution en % des contenus témoins								
Reins		95	93	97		92	93	96
Foie		93	98	98		93	96	98
Ecart de variation Reins - Foie		+ 2%	- 5%	- 1%		- 1%	- 3%	- 2%
Cobalamines en μg								
Reins	4342 (66%)	521 (59%)	227 (52%)	120 (51%)	2812 (55%)	509 (58%)	165 (52%)	122 (57%)
Foie	2201 (34%)	369 (41%)	213 (48%)	114 (49%)	2299 (45%)	367 (42%)	150 (48%)	91 (43%)
Reins + Foie	6543	890	440	234	5111	876	315	213
Diminution en % des contenus témoins								
Reins		88	95	97		82	94	96
Foie		83	90	95		84	93	97
Ecart de variation Reins - Foie		+ 5%	+ 5%	+ 2%		- 6%	+ 1%	- 1%

provoque une fixation relative plus grande en cobalamines totales et donc, par différence, en analogues cobalamines dans le foie. Il faut signaler en ce qui regarde les femelles axéniques témoins que la proportion des cobalamines-B12 rénales est inhabituellement basse (57 et 55p.100). Or, les valeurs citées pour le régime équilibré correspondent à un cas particulier en raison du groupement non homogène de deux lots. Cela est dû aux 5 rattes AN-1, en période d'allaitement pour 4 d'entr'elles, qui présentent des proportions inversées entre les deux organes. En voici les moyennes :

<u>Vitamine B12</u>				<u>Cobalamines</u>		
(en µg)				(en µg)		
	<u>contenus</u>	<u>(% du</u>	<u>teneur</u>	<u>contenus</u>	<u>(% du</u>	<u>teneur</u>
		<u>total)</u>	<u>/ g</u>		<u>total)</u>	<u>/ g</u>
<u>Lot AP-1</u>						
Reins	3460	(64)	1628	3670	(59)	1734
Foie	1878	(36)	224	2522	(41)	295
<u>Lot AN-1</u>						
Reins	1712	(44)	637	1783	(37)	662
Foie	2188	(56)	122	2031	(63)	138

Nous avons tout lieu de penser que la ~~valeur~~^{faible} plus ~~importante~~ des contenus rénaux dans le lot AN-1 est liée au prélèvement par les portées qui se fait sentir malgré la dose "normale" (5000 μg /jour) de vitamine B12 de la ration alimentaire. La comparaison entre foie et reins montre que cet appel s'effectue préférentiellement aux dépens des réserves de la cellule rénale, ce qui est bien conforme à nos observations antérieures et explique le rapport paradoxal des contenus des deux organes dans le lot AN-1. Par ailleurs, les réserves pour les rattes en fonction des autres régimes présentent les mêmes particularités que chez les mâles : variations dans les contenus en vitamine B12 des reins liées à l'apport du supplément alimentaire, peu de variations pour les contenus en cobalamines.

L'effet des régimes carencés diffère selon qu'il s'agit du rat normal ou axénique. Chez les rats à flore microbienne, la diminution la plus importante concerne la vitamine B12 des reins et

la moins importante est celle des cobalamines du foie (TABLEAU XIX). Cette divergence entre les variations respectives de la vitamine B12 et des cobalamines totales met en relief l'activité de la flore intestinale qui synthétise surtout des analogues cobalamines. Rien de tel chez les rats axéniques où les diminutions sont bien plus importantes et du même ordre de grandeur pour les reins et pour le foie, les écarts de variation en pourcentage entre les reins et le foie étant au maximum de 6 p.100. La seule remarque que l'on peut faire a trait à la diminution moins grande des cobalamines totales dans les lots de première génération au régime carencé : il se pourrait que ce soit une forme d'adaptation précoce au régime carencé tendant à la fixation ou conservation des analogues cobalamines dans les organes de réserve.

- TABLEAU XXXIX -

Contenus totaux en cobalamines B12 des reins des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Les TABLEAUX XXXIX pour les contenus totaux des reins et XL pour ceux des foies exposent plus en détail les effets des divers régimes carencés sur l'évolution des réserves chez 104 rats mâles et 104 rats femelles répartis par lignées, générations et portées. Nous ne les décrirons pas et nous contenterons de noter une diminution progressive des valeurs moyennes au fil des générations subissant la carence, et ce, malgré les suppléments limités de vitamine B12 dans le régime qui ne viennent, en général, que compenser des pertes dues aux gestations. Si nous considérons les valeurs rénales, cette diminution semble s'arrêter à un certain seuil, de l'ordre de 50 µg pour les cobalamines ou la vitamine B12 des femelles, de l'ordre de 70 à 60 µg pour les contenus homologues chez les mâles. Pour ce qui est du foie les contenus atteignent des valeurs très basses (jusqu'à 10-20 µg), aussi bien chez les rats mâles que chez les femelles tandis que les cobalamines totales gardent des valeurs relativement élevées (80 à 100 µg). Le seul point qu'il est important de souligner concerne les lots ayant donné des portées malformées (AO-1 et AN-1) et ceux comprenant des rats mâles hydrocéphales (AN-34, AN-35)

- TABLEAU XXXIX -

Contenus totaux en cobalamines-B12 des REINS des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			valeurs extrêmes	valeurs moyennes	valeurs extrêmes	valeurs moyennes
(Régime équilibré)						
AP-1	8	3	3720-4707	4342	2596-3960	3315
(Régime carencé)						
AL-1	11	6	880-1190	1090	112-328	179
AM-1	10	3	52-305	157	35-304	136
AO-1	5	5	110-320	222	151-292	193
AP-1	4	8	231-247	242	168-193	179
(Régime subcarencé)						
AN-1	2	7	191-292	241	196-275	235
AN-2	5	6	180-275	222	184-243	225
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	6	9-14	247-436	323	213-461	305
AN-32	4	3	79-139	105	54-68	61
AN-33	16	2-3	58-149	110	44-128	75
	4	15	86-183	130	81-128	105
AN-34(H)*	17	1-3	39-106	73	38-61	51
AN-35(H)*	7	2-4	66-140	110	48-83	63
AN-41	3	12	91-100	94	62-81	72
AN-42	2	12	54-78	66	61-78	70
Rats femelles						
(Régime équilibré)						
AN-1	5	5	1165-2627	1783	1231-2801	1712
AP-1	6	3	3239-3881	3670	3059-3806	3460
(Régime carencé)						
AL-1	5	6	830-1100	1012	201-278	247
AM-1	5	3	119-326	218	115-156	134
AO-1	4	5	224-254	244	201-273	235
(Régime subcarencé)						
AN-1	7	4-7	78-204	165	113-227	181
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	9	9-14	173-346	254	184-314	229
AN-32	5	3-4	138-374	255	68-162	118
AN-33	16	2-3	36-143	81	29-73	49
	3	15	124-175	130	79-104	94
AN-34	17	1-3	43-84	62	27-61	44
AN-35	12	1-4	37-91	56	37-58	45
AN-41	7	12	71-120	91	58-157	86
AN-42	3	12	51-69	58	55-66	78

* lot AN-34= 6 hydrocéphalies légères; lot AN-35= 1 hydrocéphalie grave

- TABLEAU XL -

Contenue totaux en cobalamines-B12 des FOIES des rats aréniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Mois	Cobalamines valeurs		Vitamine B12 valeurs	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
(Régime équilibré)						
AP-1	8	3	1835-2440	2201	1320-2060	1780
(Régime carencé)						
AL-1	11	6	660-936	759	156-264	202
AM-1	10	3	68-309	153	43-126	81
AO-1	5	5	73-148	103	18-88	49
AP-1	4	8	142-217	168	32-96	71
(Régime subcarencé)						
AN-1	2	7	204-210	207	59-63	61
AN-2	5	6	162-260	216	24-52	38
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	6	9-14	181-278	221	91-179	127
AN-32	4	3	94-107	100	42-64	52
AN-33	16	2-3	74-233	116	14-38	24
	4	15	55-185	97	19-104	42
AN-34 (H)*	17	1-3	42-148	93	6-82	27
AN-35 (H)*	7	2-4	40-139	97	12-37	25
AN-41	3	12	88-131	110	16-18	17
AN-42	2	12	88-102	95	15-18	16
Rats femelles						
(Régime équilibré)						
AN-1	5	5	1153-3457	2031	1010-2440	2188
AP-1	6	3	2043-2905	2522	1210-2372	1878
(Régime carencé)						
AL-1	5	6	684-804	742	180-300	230
AM-1	5	3	85-325	190	76-106	90
AO-1	4	5	77-150	119	45-106	73
(Régime subcarencé)						
AN-1	7	4-7	87-291	150	53-125	77
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	9	9-14	110-262	181	124-227	160
AN-32	5	3-4	45-74	59	41-86	56
AN-33	16	2-3	42-150	85	6-39	19
	3	15	60-202	73	16-115	73
AN-34	17	1-3	40-229	71	5-58	22
AN-35	12	1-4	45-104	63	13-29	22
AN-41	7	12	82-155	126	15-25	20
AN-42	3	12	71-82	74	11-16	13

* lot AN-34= 6 hydrocéphalies légères; lot AN-35= 1 hydrocéphalie grave

Réerves en cobalamines-B₁₂ des rats axéniques .

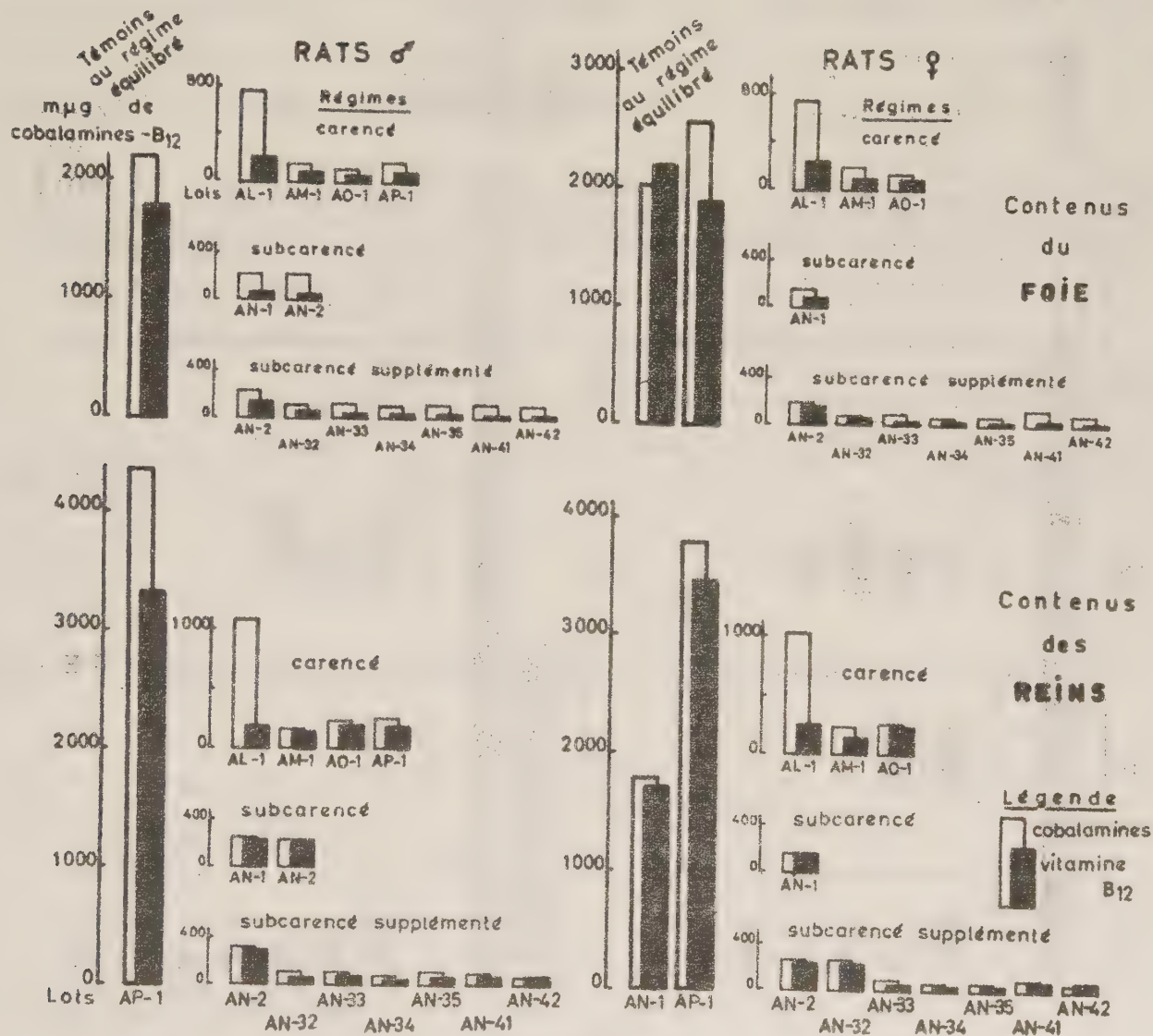


Figure 22

Teneurs par g des cobalamines - B₁₂ des rats axéniques.

Témoins
au régime
équilibré.

mg
de cobalamines-B₁₂

RATS ♂

Témoins
au régime
équilibré.

RATS ♀

Teneurs
du
FOIE

Teneurs
des

REINS

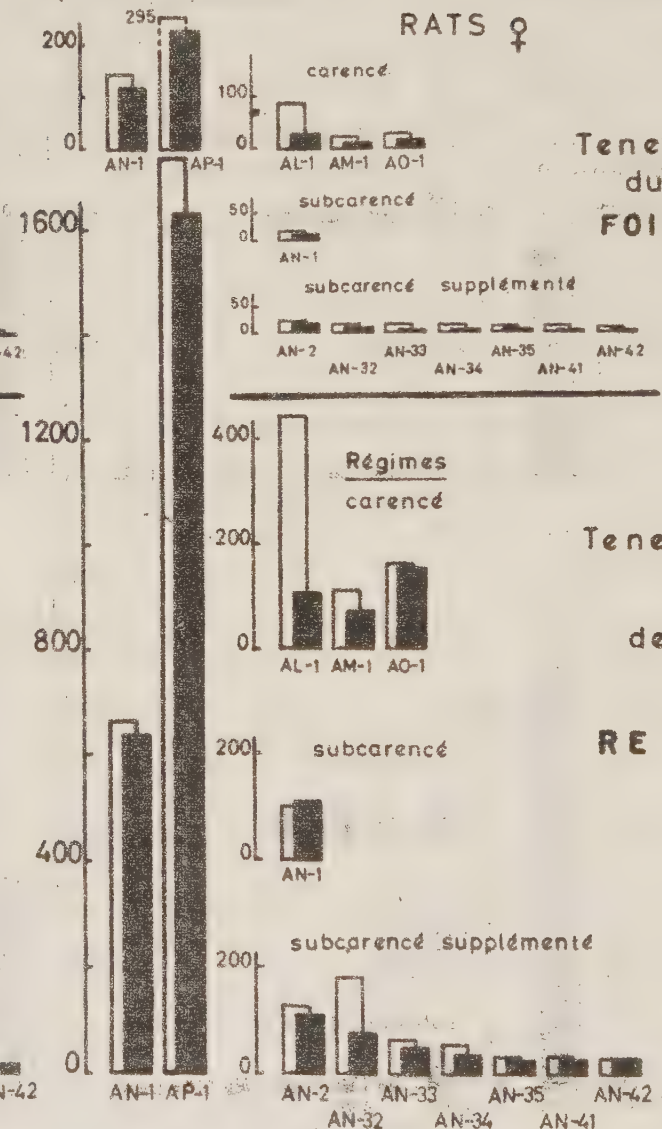
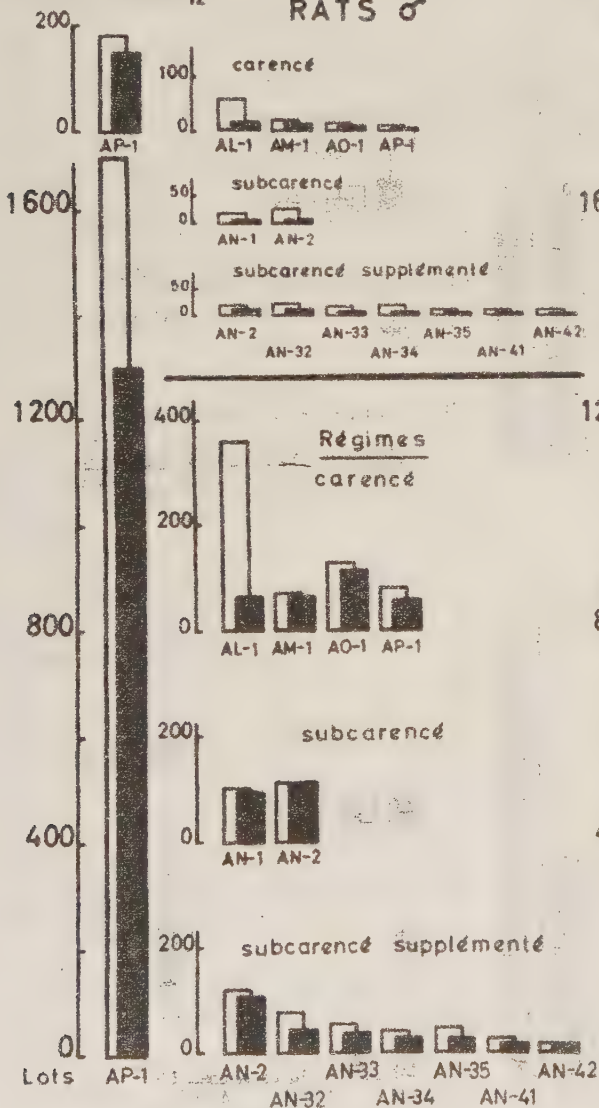


Figure 23

où rien n'indique une déficience particulière des réserves B12, ce qui ne veut pas dire que le défaut de vitamine n'est pas à mettre en cause dans les besoins dynamiques, à un certain stade des différenciations tissulaires du jeune rat. Les valeurs moyennes des TABLEAUX XXXIX et XL sont représentées graphiquement dans la FIGURE 22 et il est aisé de voir combien les contenus s'amenuisent sous l'effet des régimes carencés, les contenus les plus bas étant ceux des rats axéniques dont le régime des mères a reçu une supplémentation de 10 μg /jour pendant les gestations malgré quoi leurs réserves ~~se~~ s'épuisent du fait des portées successives.

- TABLEAU XL -

Contenus totaux en cobalamines-B12 des Foies des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

- FIGURE 22 -

Réserves en cobalamines-B12 des rats axéniques

La FIGURE 23 montre les valeurs moyennes comparées des teneurs par gramme. Leur analyse aboutit à des conclusions analogues à celles de la figure précédente, à ceci près que l'échelle choisie permet de bien mettre en valeur la très grande capacité de fixation du tissu rénal du rat.

- FIGURE 23 -

Teneurs par g en cobalamines-B12 des rats axéniques

La confrontation de ces deux figures avec les FIGURES 9 et 10 représentant respectivement les réserves et les teneurs par g des mêmes organes chez les rats à flore microbienne met en évidence le fait que les réserves sont bien moins élevées chez les lots de Rats axéniques au régime subcarence "supplémenté" (*) ce qui ne fait que refléter les comparaisons faites sur les courbes de croissance (Fig.21). On peut dire la même chose en ce qui concerne les teneurs par gramme des lots AN-2 à AN-42 mais d'une façon générale, tous les rats axéniques, que le régime soit carencé ou subcarencé, présentent des teneurs inférieures à celles des rats normaux au régime totalement carencé.

(*)- il s'agit, bien sûr, d'une supplémentation du régime de la mère, ayant eu une incidence sur la vie foetale et l'allaitement du jeune rat.

- TABLEAU XLI -

Variations des teneurs moyennes en vitamine B12 et en cobalamines totales des reins et des foies des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Les résultats du TABLEAU XLI (teneurs moyennes par g d'organe) vont de pair avec les valeurs rapportées pour les contenus totaux. On retrouve en plus accusée une tendance déjà signalée chez les rats à microflore : les cobalamines totales du foie diminuent relativement peu, ce qui revient en somme, par ~~comparaison~~ ^{comparaison} avec la grande diminution de vitamine B12 à une fixation préférentielle des analogues cobalamines par cet organe. Nous l'avons déjà observé chez les rats à microflore dont le contenu digestif est riche en cobalamines (et surtout en cobalamines autres que la vitamine B12); il est intéressant de retrouver ce phénomène chez un organisme axénique sans autre source d'analogues cobalamines que celles qui résultent du métabolisme des réserves transmises par la mère ou de la conversion de la vitamine B12 proprement dite provenant de l'apport très limité du régime.

- TABLEAU XLII -

Teneurs par g des cobalamines-B12 des reins des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

- TABLEAU XLIII -

Teneurs par g des cobalamines-B12 des foies des rats axéniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Ainsi que nous l'avons fait pour les contenus totaux nous présentons le détail des résultats concernant les teneurs par g d'organes pour chaque lot dans les TABLEAUX XLII (reins) et XLIII(foies) L'analyse des teneurs rénales fait ressortir les diminutions progressives de ces valeurs chez les animaux ayant pu réaliser plusieurs gestations grâce à la supplémentation du régime subcarencé de telle sorte que les teneurs les plus basses (20 $\mu\text{g/g}$) correspondent à la 4ème génération (AN-41 et AN-42) . Les mêmes remarques peuvent être

- TABLEAU XLI -

Variations des teneurs moyennes en vitamine B12 et en cobalamines totales
des Reins et des Foies des rats aréniques aux régimes équilibré, carencé,
subcarencé et subcarencé supplémenté

Organes	Vitamine B12 en μg par g d'organe							
	Régimes : Rats mâles				Régimes Rats femelles			
	équilibré	carencé	subcarencé	subcarencé supplémenté	équilibré	carencé	subcarencé	subcarencé supplémenté
Nombre de rats	(8)	(30)	(7)	(59)	(11)	(14)	(7)	(72)
Reins	1631	71	106	42	1178	106	108	47
Foie	128	13	4	5	178	17	8	6
Diminution en % des teneurs témoins								
Reins		96	94	99		91	91	96
Foie		90	97	96		91	96	97
Ecart de variation Reins + Foie		+ 6%	- 3%	+ 1%		0	- 5	- 1
Cobalamines en μg								
Reins	1720	196	106	57	1247	240	99	67
Foie	160	34	23	13	223	44	15	14
Diminution en % des teneurs témoins								
Reins		89	94	97		81	93	95
Foie		79	86	92		80	93	94
Ecart de variation Reins + Foie		+ 9%	+ 8%	+ 5%		+ 1%	0	+ 1%

- TABLEAU XLII -

Teneurs par g des cobalamines-B12 des REINS des rats aréniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Mois	Cobalamines		Vitamine B12	
			valeurs		valeurs	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
(Régime équilibré)						
AB ₁₂ -L-1	5	5	1463-2018	1743	1643-2275	1963
AB ₁₂ -P-1	8	3	1535-2000	1697	987-1630	1302
(Régime carencé)						
AL-1	11	6	314-476	383	45-117	63
AM-1	10	3	22-152	72	13-148	64
AO-1	5	5	83-176	130	82-161	116
AP-1	4	8	69-85	78	49-66	58
(Régime subcarencé)						
AN-1	2	7	76-122	99	77-114	95
AN-2	5	6	95-121	109	97-123	111
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	6	9-14	77-182	122	73-173	115
AN-32	4	3	65-101	77	43-47	45
AN-33	16	2-3	36-100	60	23-68	41
	4	15	24-55	34	22-39	28
AN-34(H)*	17	1-3	29-70	45	28-46	32
AN-35(H)*	7	2-4	30-59	48	22-33	27
AN-41	3	12	24-33	27	20-21	21
AN-42	2	12	17-25	21	20-25	22
Rats femelles						
(Régime équilibré)						
AB ₁₂ -N-1	5	5	364-906	662	385-966	637
AB ₁₂ -P-1	6	3	1686-1785	1734	1438-1728	1628
(Régime carencé)						
AL-1	5	6	296-550	438	84-139	107
AM-1	5	3	74-155	109	55-96	69
AO-1	4	5	132-175	157	118-190	152
(Régime subcarencé)						
AN-1	7	4-7	44-133	99	66-139	108
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	9	9-14	75-204	125	58-179	112
AN-32	5	3-4	76-250	179	48-104	76
AN-33	16	2-3	32-119	64	24-91	40
	3	15	44-62	56	28-39	34
AN-34	17	1-3	36-86	54	26-55	37
AN-35	12	1-4	19-61	34	19-51	28
AN-41	7	12	29-38	33	20-58	31
AN-42	3	12	25-31	28	29-38	29

* lot AN-34= 6 hydrocéphalies légères; lot AN-35= 1 hydrocéphalie grave

- TABLEAU XLIII -

Teneurs par g des cobalamines B12 des FOIES des rats aréniques aux régimes équilibré, carencé, subcarencé et subcarencé supplémenté

Lots de rats et générations	Rats mâles					
	Nombre	Mois	Cobalamines valeurs		Vitamine B12 valeurs	
			extrêmes	moyennes	extrêmes	moyennes
(Régime équilibré)						
AB ₁₂ -L-1	5	5	116-165	139	66-149	106
AB ₁₂ -P-1	8	3	169-200	182	126-174	150
(Régime carencé)						
AL-1	11	6	50-78	60	12-20	16
AM-1	10	3	6-25	18	4-21	12
AO-1	5	5	13-45	29	2-21	14
AP-1	4	8	10-13	12	2-6	4,5
(Régime subcarencé)						
AN-1	2	7	17-18	17	5	5
AN-2	5	6	19-31	25	3-6	4
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	6	9-14	12-22	16	6-14	9
AN-32	4	3	18-24	21	8-14	11
AN-33	16	2-3	8-37	15	2-6	3
	4	15	3-15	7	1-12	4
AN-34(H)*	17	1-3	6-31	14	1-11	6
AN-35(H)*	7	2-4	5-15	10	1-4	2,5
AN-41	3	12	6-8	7	1,2	1,2
AN-42	2	12	7-8	8	1,3	1,3
Rats femelles						
(Régime équilibré)						
AB ₁₂ -N-1	5	5	94-191	138	82-161	122
AB ₁₂ -P-1	6	3	282-309	295	128-290	224
(Régime carencé)						
AL-1	5	6	64-107	82	17-40	26
AM-1	5	3	11-32	21	8-12	10
AO-1	4	5	20-28	24	8-24	15
(Régime subcarencé)						
AN-1	7	4-7	8-25	15	5-11	8
(Régime subcarencé supplémenté)						
AN-2	9	9-14	11-33	21	11-30	18
AN-32	5	3-4	7-23	13	10-13	11
AN-33	16	2-3	9-24	16	1-9	3,5
	3	15	6-19	14	1-10	7
AN-34	17	1-3	7-37	15	1-10	4,4
AN-35	12	1-4	6-27	10	2-5	3,5
AN-41	7	12	8-12	11	1-3	1,9
AN-42	3	12	8-9	9	1-2	1,5

* lot AN-34= 6 hydrocéphalies légères; lot AN-35= 1 hydrocéphalie grave

faites à propos du foie pour lequel des teneurs en vitamine B12 aussi basses que 1 à 2 $\mu\text{g/g}$ (Lots AN-41 et AN-42) n'avaient jamais été trouvées au cours de la présente étude. Ces valeurs témoignent de l'efficacité d'une carence, obtenue par le moyen indirect des gestations multiples compensées par un régime comportant un supplément limité de vitamine B12 ; il est d'autant plus remarquable que ces valeurs très basses s'observent chez des animaux à la croissance ralentie, certes, mais ne présentant aucun signe majeur d'un état déficient.

V - DISCUSSION SUR L'AVITAMINOSE ET LE BESOIN B12

=====

DU RAT -

=====

Notre étude a porté sur environ 560 rats au régime partiellement ou totalement carencé, comprenant 230 rats à microflore autochtone (126 adultes et 103 ratons) et 332 rats axéniques (191 adultes et 141 ratons), auxquels il faut ajouter 78 rats témoins ou de contrôle recevant de la vitamine en quantité "normale", soit un total de quelques 640 rats dont la plupart ont fait l'objet d'analyses et déterminations diverses. Les résultats obtenus ~~ayant~~ été exposés de façon détaillée, leur multiplicité nécessite maintenant une récapitulation. Nous ajouterons à celle-ci quelques commentaires relatifs à la carence B12.

1)- AGE ADULTE - Il est impossible de provoquer systématiquement des signes graves d'avitaminose B12 chez le rat adulte en utilisant un régime strictement carencé en vitamine B12, qu'on s'adresse au rat normal ou au rat axénique. Dans le premier cas les synthèses de la flore intestinale pallient la déficience du régime ; dans le second la privation alimentaire de vitamine B12 n'arrive pas à épuiser, au cours d'une seule génération, les réserves préalablement constituées. Cependant, nous avons eu quelques cas de déficience pondérale grave chez des rats axéniques de la lignée A0 mais sans rien qui rappelle les perturbations de la lignée sanguine chez l'homme ; cet état n'a été observé que chez 4 rats sur les 191 rats axéniques adultes étudiés.

2)- GESTATION - Chez le rat normal à flore autochtone la privation totale de vitamine B12 est compatible avec le déroulement normal de la gestation. Chez le rat axénique la privation totale de vitamine B12 ne perturbe pas la première gestation. Il n'en est pas de même pour les gestations suivantes. Les avortements deviennent la règle et on note des malformations embryonnaires. La normalité de

la gestation augmente quand les mères sont maintenues au régime subcarencé et qu'en plus elles reçoivent, durant toute la gravidité, un supplément quotidien de 10 μ g de vitamine B12 .

3)- NAISSANCE ET ALLAITEMENT - Chez la ratte normale totalement carencée en cyanocobalamine la gestation se solde, en général, par la naissance de portées viables, la mortalité d'ensemble pour les premières gestations n'étant que de 7 p.100 (14 morts-nés sur 189 ratons) . Dans les gestations successives le pourcentage des morts-nés varie en fonction des lignées. Chez la ratte axénique le tableau diffère profondément. Avec un régime totalement carencé la mortalité post-natale (48 premières heures), est très grande : le bilan se solde par 10 survivants sur 123 nouveau-nés, soit 92 p.100 de mortalité. En utilisant le régime subcarencé (environ 10 μ g de cyanocobalamine/ jour) , ~~celle-ci~~ n'est plus que de 10 p.100 à la première gestation mais atteint 100 p.100 dès la seconde. La survie a été de 59 ratons sur un ensemble de 157 soit 38 p.100 mais la répartition en lots en était trop dissemblable pour que puisse être assurée la continuité de la lignée. Il faut ajouter au régime de la ratte gestante un supplément de 10 μ g de cyanocobalamine/jour, et cela dès l'accouplement, pour assurer une survie partielle de la portée et obtenir des générations successives. Dans l'ensemble sur 230 nouveau-nés, 128 ont survécu, soit 55 p.100 du total. On a pu ainsi obtenir 4 générations successives de la ~~même~~ lignée.

4)- SIGNES DE L'AVITAMINOSE B12 . - Les paragraphes précédents montrent combien il est difficile de réaliser cette avitaminose chez le rat. Nous l'avons obtenue pour la première fois chez le rat axénique. Cependant le tableau donné par cette avitaminose est peu satisfaisant car il ne présente pas de signes permettant de se livrer à une étude approfondie de la carence débouchant sur le mécanisme d'action de la vitamine. En effet, le signe le plus caractéristique de l'avitaminose B12 du rat est l'atteinte des possibilités de reproduction, ce qui se traduit par l'interruption de la lignée.

La ratte axénique ne semble pas touchée (en dehors d'un relatif épuisement des réserves) tandis que sa progéniture, quand elle vient à terme, n'a qu'une vie éphémère. Ce n'est qu'au prix de la supplémentation limitée en vitamine B12 que nous avons réussi à faire apparaître divers états de carence liés, sans doute, à la gravité de la déficience des réserves chez la mère. Ces manifestations de carence seront donc d'autant plus précoces que le manque de vitamine se fait sentir davantage pour l'ensemble mère-portée, étant bien entendu que la mère est prioritaire dans l'utilisation des réserves ou de l'apport limité. De ce fait, la gravité des états de carence sera marquée par un ordre chronologique :

- troubles de gestation conduisant à des arrêts de grossesse (avec résorptions foetales) et des malformations embryonnaires dont la plus importante est l'exencéphalie, à notre avis beaucoup plus nombreuses que celles que nous avons trouvées, nombre d'interruptions de grossesse ayant dû passer inaperçues ;

- mortalité atteignant presque 100 p.100 au cours des premières 48 heures de la vie néonatale ;

- malformations ^{au cours} de l'allaitement du type ~~de~~ l'hydrocéphalie, accompagnée le plus souvent d'atteinte de l'ébauche optique. Bien que ce soit la malformation classique nous ne l'avons observée que dans 5 p.100 des cas, soit 10 sur un total de 197 ratons axéniques survivant à la naissance, et dont certains n'ont été sacrifiés qu'à l'âge adulte. Chez les lots atteints la mortalité néonatale oscillait seulement entre 10 et 24 p.100 ;

- croissance pondérale ralentie chez les survivants sans diminution du rapport Poids/Taille : la carence augmente la durée du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de poids et de taille qui caractérise l'état adulte. Il n'y a pas de relations entre les malformations et les retards de poids : les hydrocéphales sont maigres mais les ratons de même lot se classent en tête des perfor-

mances de croissance chez les rats carencés ; inversement des lignées sans malformations ont le développement pondéral le plus bas. Nous considérons que ces dernières représentent la meilleure adaptation à la carence ;

- des modifications du pelage qui devient rêche, clair-semé, de couleur jaune sale.

Il convient d'insister sur l'absence de tout signe d'anémie même chez les rats hydrocéphales ou ceux à croissance très ralentie pour qui on note parfois une tendance à la polyglobulie avec, peut-être, microcytose.

Nous rappelons encore la rareté de manifestations de carence chez l'adulte. Les rats de poids le plus médiocre parviendront à progresser même s'ils n'atteignent pas tous le poids et la taille normale. En régime subcarencé ce phénomène est plus net, tous les rats atteindront le palier pondéral du régime équilibré avec seulement un délai beaucoup plus long.

5)- LES RESERVES DANS L'AVITAMINOSE B12 - Les réserves "mobilisables" sont localisées dans les reins et dans le foie, les reins présentant le plus fortes teneurs et le caractère le plus labile, en ce sens que les réserves rénales reflètent plus fidèlement l'apport ou l'utilisation de vitamine B12 que la réserve hépatique.

La baisse des réserves de vitamine B12 chez les rats axéniques de première génération par rapport aux témoins atteint généralement 90 p.100 (elle est moins importante pour les analogues cobalamines) ; cette baisse s'accroît encore au cours des générations successives jusqu'à 99 p.100. Bien qu'importante la baisse des réserves chez les rats normaux n'atteint pas ces valeurs ; elle peut atteindre cependant 90 p.100 au bout de plusieurs générations de carence *alimentaire*.

Les biosynthèses intestinales permettent aux rats normaux de garder un minimum de réserves "mobilisables" à travers plusieurs

générations maintenues en carence. Ce palier s'établit à un contenu de 200 µg de vitamine B12 pour les reins et à 50 µg pour le foie (teneurs/ g correspondantes : 100 µg et 5 µg). Ce maintien d'un certain niveau des réserves ne se produit pas chez les rats axéniques qui présentent dans les cas des niveaux les plus bas des réserves qui ne sont plus que de l'ordre de 50 µg pour les reins et de 10 µg pour le foie (teneurs/g correspondantes : 20 µg et 1,2 µg). On ne sait dans ce cas s'il s'agit d'un seuil inférieur des réserves lié à la viabilité ou s'il serait encore possible de l'abaisser.

Curieusement, ces baisses n'ont pas d'effet très apparent. Il y a certes une relation entre les niveaux des réserves et les courbes de croissance. Par contre, on ne peut trouver de rapport entre le niveau des réserves et l'incidence des malformations chez les jeunes rats (les réserves basses des ratons malformés s'expliquent par la diminution pondérale des organes). De même, les réserves respectives des mères et des portées indiquent que la mortalité dépend davantage de la possibilité d'approvisionnement que de la grandeur de la réserve. Les contenus des portées issues de la première génération de rattes axéniques peuvent être assez importants, mais ceci ne les épargne pas et les ratons sont éliminés ; par contre, lorsqu'il y a un certain apport comme dans le régime subcarencé, les réserves de la mère et des portées peuvent être beaucoup plus basses, les ratons ont davantage de chances de survivre.

6)- LE BESOIN EN VITAMINE B12 DU RAT - Le besoin minimum ne peut être fixé que grâce au rat axénique. Or, s'il est possible de le faire durant la période de reproduction, par suite des accidents graves qui surviennent, c'est beaucoup moins aisé en dehors de cette période. On peut affirmer que le besoin de conservation de la lignée s'établit à 20 µg de vitamine B12/jour durant la gestation et avec des réserves effondrées. Une dose quotidienne plus basse mais supérieure à 10 µg et maintenue pendant plus longtemps devrait suffire aussi à permettre les reproductions. Du fait de l'utilisation prépondérante de la vitamine en période de reproduction il est

très vraisemblable qu'une dose de 10 μg de vitamine B12 par jour permet encore une mise en réserve et que le besoin minimum réel d'entretien chez le rat adulte doit être inférieur à 10 μg de vitamine B12/jour. On ne peut ^{s'empêcher} ~~de~~ de rapprocher cette remarque, sur la petitesse du besoin chez le rat, des études effectuées principalement chez l'homme sur la vitesse de renouvellement de la vitamine B12 (77,78,83), d'où il ressort que le besoin en cette vitamine est quantitativement le plus faible de toutes les vitamines du groupe B.

Nous remarquerons, en outre, que la présence d'une microflore intestinale chez le rat normal rend généralement inutile tout apport extérieur. Même après plusieurs générations de rats au régime totalement carencé les contenus caecaux moyens de ces rats (400 μg de vitamine B12) représentent 20 fois le besoin de reproduction. Or, lors des gestations et de l'allaitement la richesse de ce contenu est normalement multipliée 2 ou 3 fois. Les valeurs B12 des fèces quotidiennes (200 μg en moyenne), représentent 10 fois le même besoin et cette valeur peut être multipliée par 10 à 25 fois chez les rats en accouplement. Bien entendu, dans ces deux cas, les analogues cobalamines sont encore plus abondants mais nous ne savons pas s'ils sont utilisables directement ou après interconversion en vitamine B12 .

*

* *

Le ralentissement de la croissance du jeune rat (et non l'amaigrissement), c'est-à-dire une miniaturisation harmonieuse de l'animal, nous apparaît comme la manifestation la plus générale de la carence, à la fois preuve de l'atteinte et de l'adaptation du Rat au régime déficient en vitamine B12 . En somme, la croissance médiocre ou ralentie représenterait pour le rat "nain" une manière de diminuer ses besoins en vitamine.

- 14 -

Le fait que la croissance ralentie soit liée à des réserves basses et à l'absence d'autres signes et par ailleurs, que des réserves plus importantes chez la mère et chez les ratons s'accompagnent de croissances meilleures dans les lots comportant des malformations, incite à penser que les signes de gravité de l'avitaminose B12 chez le rat sont liés à un défaut d'adaptation, au maintien d'une intensité plus grande du métabolisme utilisant davantage de vitamine et se répercutant à un moment donné sur telle ou telle différenciation tissulaire. C'est dans le défaut d'adaptation par maintien d'un métabolisme élevé et donc de dépenses en vitamine qui accusent le déséquilibre de la carence B12, que pourrait se situer l'origine au niveau cellulaire de l'anémie mégaloblastique chez l'homme que nous n'avons pas vu se reproduire chez le rat.

VI - CONCLUSIONS (deuxième partie)

=====

CROISSANCE -

1)- Le retard de croissance est le signe le plus caractéristique de l'avitaminose B12 du rat. Seulement dans des rares cas graves il s'accompagne d'amaigrissement. Le plus souvent il s'agit d'un simple ralentissement portant à la fois sur la taille et le poids et donnant au rat une allure plus "jeune" que son âge.

2)- L'état carenciel est très long à se manifester, aussi le rat axénique et le rat normal de première génération au régime carencé depuis le sevrage ont, le plus souvent, une croissance normale.

3)- Alors que le rat axénique mâle de première génération maintenu au régime subcarencé (10 μ g de vitamine B12/jour) atteint le poids de 400-500g en 5 à 6 mois, ce délai est porté à 12-14 mois chez les rats carencés des générations suivantes, mais le rat peut atteindre son poids maximum. Le besoin minimum d'entretien est donc inférieur à 10 μ g/jour, comme nous venons de le

suggérer.

4)- Par rapport à la première génération prise en référence, l'écart de poids des générations ultérieures varie en fonction de l'âge du rat. Chez le rat axénique la diminution qui est de 70 p.100 à l'âge d'un mois tombe à 45 p.100 à l'âge de 4 mois ; chez le rat normal au régime carencé les écarts sont respectivement de 35 p.100 à 17 p.100. Il y a donc une adaptation du rat à la carence suivant l'âge.

5)- Chez les rats normaux au régime carencé il n'y a pas progression dans l'insuffisance pondérale au fil des générations Suivant les lots il peut y avoir une adaptation au régime carencé plus ou moins grande qui n'est pas liée à la durée de la carence.

REPRODUCTION -

6)- La première gestation des rattes normales ou axéniques de première génération, au régime carencé depuis le sevrage, n'est pas perturbée. La mortalité néo-natale des portées axéniques est, en moyenne, de 92 p.100 ; celle des portées normales est de 6 p.100.

7)- Les lignées axéniques nécessitent pour survivre un apport de 10 μ g de vitamine B12 par jour, supplémenté de 10 μ g pendant le temps de la gestation. Le pourcentage de mortinatalité est alors généralement inférieur à 50 p.100. Le besoin minimum de reproduction est donc de 20 μ g/jour qu'ils soient apportés durant cette période ou qu'ils proviennent des réserves.

8)- Les lignées normales supportent très bien le régime carencé au cours des générations successives. Leur mortalité néo-natale pour l'ensemble des premières gestations n'est que de 7 p.100.

MALFORMATIONS -

9)- Le nombre de ratons axéniques malformés observés est relativement restreint : 4 exencéphales, 1 méningocèle et 10 hydrocéphales. Nous n'avons pas constaté de malformation chez les rats normaux.

10)- En cours de gestation, la malformation la plus fréquente est l'exencéphalie. Cette anomalie, pas plus que le méningocèle, n'affecte le développement du fœtus, puisque nous l'avons trouvée chez 2 mort-nés de grosseur presque normale. Des cas plus nombreux ont dû passer inaperçus par suite d'avortements ou de portées disparues à la naissance. Le nombre de résorptions fœtales a dû dépasser aussi les 9 cas observés.

11)- En cours d'allaitement, nous n'avons trouvé que la malformation d'hydrocéphalie avec anophtalmie et déformations osseuses : 4 hydrocéphales graves et 6 légers apparus chez des lots à faible mortalité néo-natale (10 à 24 p.100) et à croissance modérément ralentie.

SANG -

12)- Aucun signe d'anémie n'est apparu chez les rats axéniques et les rats normaux au régime carencé. Aucune des formes anormales typiques des cellules sanguines signalées dans l'anémie pernicieuse n'a pu être observée.

13)- Dans quelques cas de rats axéniques et de rats normaux très amaigris et à l'aspect déficient, on a constaté une polyglobulie jusqu'à 10-12 millions d'hématies/mm³. En l'absence d'augmentation sensible concomitante de l'hématocrite, il se peut qu'il s'agisse d'une polyglobulie avec microcytose.

RESERVES -

14)- En régime équilibré les teneurs/g de vitamine B12 des reins augmentent au cours de l'allaitement et deviennent de plus

en plus importantes à l'approche du sevrage ; inversement les teneurs /g du foie et de la carcasse ont tendance à diminuer au cours de la même période pour aboutir aux niveaux habituels chez l'adulte. On retrouve cette évolution, dans une certaine mesure, chez les jeunes rats normaux ou axéniques, soumis aux régimes carencés.

15)- La diminution des teneurs en vitamine B12 chez les rats axéniques au régime subcarencé atteint 99 p.100 aussi bien dans les reins que dans le foie à la 4ème génération (teneurs respectives 20 et 1,2 $\mu\text{g/g}$). Chez les rats normaux au régime carencé, la diminution est moins forte au départ pour atteindre un palier de 100 $\mu\text{g/g}$ (reins) et de 5 $\mu\text{g/g}$ (foie) au cours de 6 générations successives. Les reins ont des réserves B12 plus labiles que celles du foie et la vitamine B12 s'y fixe en priorité lors d'un apport extérieur.

16)- Les cobalamines totales diminuent lentement, notamment dans le foie où les baisses sont seulement de 57 et 26 p.100 respectivement chez les rats axéniques et les rats normaux au régime carencé seulement depuis le sevrage. Dans les deux cas la baisse devient plus importante au cours des générations successives aux régimes subcarencé et carencé, tout en restant inférieure à celle de la vitamine B12. Le foie retient davantage les analogues cobalamines que la vitamine B12, surtout chez les rats normaux.

17)- Les prélèvements des réserves maternelles par les portées sont importants chez nombre de rattes axéniques ou de rattes normales de lère génération au régime carencé. Les portées la naissance représentent en vitamine B12 l'équivalent de la réserve "Foie + Reins" de la mère; la portée normale au sevrage, l'équivalent du contenu total de la mère. En régime subcarencé supplémentaire il y a une sorte d'adaptation à partir de la 2ème génération car les prélèvements des portées successives ne représentent plus que 20 p.100 de ceux de la première gestation.

18)- La mortalité n'est pas liée aux teneurs en vitamine des rats mais à l'impossibilité d'approvisionnement quotidien par la mère. Le besoin de la mère est prioritaire. En cas de prélèvement important sans autre apport (rattes axéniques au régime carencé), le plus souvent la mère dévore la portée.

19)- Il y a une relation entre l'épuisement des réserves et les courbes de croissance basses mais il n'y a pas de rapport entre les réserves basses et les hydrocéphales. Ces malformations surviennent au contraire chez des lots aux réserves assez élevées et aux croissances améliorées ; elles sont l'exemple d'un déséquilibre dans l'utilisation plus intense de la vitamine. Les lignées sans malformations aux réserves très basses ont le développement pondéral le plus bas ; cette croissance ralentie apparaît comme une meilleure adaptation à la carence.

MICROFLORE INTESTINALE -

20)- Les contenus caecaux moyens en vitamine B12 des rats normaux au régime carencé depuis plusieurs générations représentent 20 fois le besoin minimum de reproduction. Les fèces de 24 heures contiennent de la vitamine B12 pour 10 fois le même besoin.

21)- La gestation et l'allaitement des rattes normales ont pour effet de multiplier par 2-3 fois la vitamine B12 des contenus caecaux et par plus de 10 fois celle des fèces.

22)- Une monoflore de Veillonella s'implante rapidement dans le caecum du rat axénique en subcarence et donne lieu à une élimination progressivement augmentée de cobalamines et de vitamine B12. En deux mois les réserves B12 de ces rats axéniques s'élèvent de 11 p.100 dans les reins et de 36 p.100 dans le foie.

*

* *

*

- B I B L I O G R A P H I E -

=====

- 1)- ABELSON (P.H.), DARBY (H.H.)-

The synthesis of vitamin B12 in the digestive system of sheep
Science, 1949, 110, 566.

- 2)- ABRAMS (R), LIBENSON (L), EDMONDS (M).-

Conversion of cytidine 5'-phosphate to deoxycytidine 5'-phosphate in cell-free mammalian extracts.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1960, 3(3), 272-4.

- 3)-ABRAMS (R), DURAISWAMI (S).-

Deoxycytidylate formation from cytidylate without glycoside-cleavage in Lactobacillus leichmanii extracts containing vitamin B12 coenzyme.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1965, 18(3), 409-14.

- 4)- ADRIAN (J).-

Le dosage microbiologique des vitamines du groupe B.
Cahiers techniques du C.N.C.E.R.N.A., IV. Ed.C.N.R.S., Paris , 1959, 183 p.

- 5)- ARESHKINA (L.J.), ANDREEVA (N.A.), KUTSEVA (L.S.), BUKIN (V.N.).-

Combined action of vitamin B12 and folic acid in purine synthesis (en russe).
Dokl.Akad.Nauk. SSSR, 1963, 148, 704-7 ; Chem.Abst., 58, 12796 h.

- 6)- ARESHKINA (L.J.), SKOROBOGATOVA (E.P.), KUTSEVA (L.S.).-

Vitamin B12 in the synthesis of active forms of folic acid.
Dokl.Acad.Nauk. SSSR, 1966, 167(4), 9356; Chem.Abst., 1966, 65, 4295 h.

- 7)- ARESHKINA (L.J.), KUTSEVA (L.S.), SKOROBOGATOVA (E.P.).-

The cobamide composition of aminopterine-resistant folate reductase.
Dokl.Akad.Nauk.SSSR, 1966, 169(1), 227-8; Chem.Abst., 1966, 65, 12492 f.

8)- ARNSTEIN (H.R.V.) .-

The function of vitamin B12 in animal metabolism.
Biochem.Soc.Symp. n° 13; The biochem. of Vit.B12.
Cambridge Univ. Press., 1955, 92-108.

9)- ARNSTEIN (H.R.V.), WHITE (A.M.).-

The function of vitamin B12 in amino-acid and protein synthesis by Ochromonas malhamensis .
Vitamin B12 und Intrinsic factor.2. Europäisches Symposium, Hamburg, 1961, 211-6. Ed. F. Enke, Stuttgart.

10)- ARNSTEIN (H.R.V.), WHITE (A.M.).-

Activity of cyanocobalamin, dimethyl-benzimidazolyl-cobamide coenzyme and some of their analogues for the metabolism of Ochromonas malhamensis.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112 (2), 807-22.

11)- ASCHEKENASY (A.), PARIENTE (P.).-

Suppléance de la méthionine à l'égard de la vitamine B12 dans la réfection pondérale de l'inanition protéique. Supériorité des extraits antipernicieux sur la vitamine B12 dans la réparation de l'érythropoïèse
C.R.Acad.Sci., Paris, 1950, 230, 2339-41.

12)- ASUNTA (J.), KOIVUSALO (M.), SUORSA (M.).-

Excretion of methylmalonate and succinate in the urine of rats during deficiency of vitamin B12 and after administration of propionate.
Acta physiol.Scand., 1966, 66, 346-52.

13)- AUJARD (C.), CHANY (E.).-

Influence de la vitamine B12 et de la choline sur le pouvoir stéatogène d'un régime hypoprotéique de teneur variable en graisses et vitamines B.
C.R.Soc.Biol., 1957, 151(2), 251-3.

14)- BAKER (R.A.).-

Volatile fatty acids in aqueous solution by gas-liquid chromatography.
J. Gas.Chromatog., 1966, 418-9.

- 15)- BARKER (H.A.), SMYTH (R.D.), WEISSBACH (H.), TOOHEY (J.I.),
LADD (J.N.), VOLCANI (B.E.). -

Isolation and properties of crystalline cobamide coen-
zymes containing benzimidazole or 5,6-Dimethylbenzimi-
dazole.

J.Biol.Chem., 1960, 235, 480-8.

- 16)- BARKER (H.A.), SUZUKI (F.), IODICE (A.), ROOZE (V.).-

Glutamate mutase reaction.

Ann.N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 644-54.

- 17)- BARNES (R.H.), FIALA (G.).-

Effects of the prevention of coprophagy.II.Vitamin B12
requirement.

J. Nutrition, 1958, 65, 103-14.

- 18)- BECK (W.S.), GOULIAN (M.), HOOK (S.).-

The metabolic functions of vitamin B12 .2.Participa-
tion of vitamine B12 in the biosynthesis of DNA and
its acid-soluble precursors.

Biochim.Biophys.Acta., 1962, 55, 470-8.

- 19)- BECK (W.S.), GOULIAN (M.), KASHKET (S.).-

Role of vitamin B12 in deoxyribonucleic acid synthe-
sis : study of a model megaloblast.

Trans.Assoc.Am.Physicians, 1965, 78, 341-61; Chem.Abst.,
1966, 65, 1073g.

- 20)- BIESTEK (A.), BOGUCKA(J.),GAJCY (H.), KAKOL (H.).-

Isolation of vitamin B12 - synthesizing bacteria
(en polonais) Acta Physiol.Polon., 1959, 10, 115-23;

Chem.Abst., 1960, 54, 22838 c.

- 21)- BISWAS (D.K.), JOHNSON (B.C.).-

Role of vitamin B12 in Carbohydrate metabolism.

Vitamin B12 und Intrinsic Factor.2.Europäische Sympo-
sion, Hamburg, 1961, 205-11 ; Ed.F.Enke, Stuttgart.

22)- BISWAS (D.K.), KISLIUK (R.L.). -

Studies on the role of vitamin B12 in Bacillus megatherium.

Feder.Proc., 1965, 24, n° 2, part I, 421.

23)- BLAKLEY (R.L.).-

Cobamides and ribonucleotide reduction.I. Cobamide stimulation of ribonucleotide reduction in extracts of Lactobacillus leichmanii.

J.Biol.Chem., 1965, 240(5), 2173-80.

24)- BLAKLEY (R.L.).-

Cobamides and ribonucleotides reduction.II.Estimation of the enzymic formation of purine and pyrimide deoxyribonucleotides by the use of the diphenylamine reagent.

J.Biol.Chem., 1966, 241(1), 176-9.

25)- BLAKLEY(R.L.).-

B12 - dependent synthesis of deoxyribonucleotides.

Fed.Proc., 1966, 25 n°6, 1633-8.

26)- BLAYLOCK (B.A.), STADTMAN (T.C.).-

Biosynthesis of methane from the methyl moiety of Methylcobalamin in Extracts of Methanosarcina barkeri.

Ann.N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 799-803.

27)- BOND(G.), ADAMS (J.F.), KENNEDY (E.H.).-

Vitamin B12 analogs in non legume root nodules.

Nature, 1965, 207 (4994), 319-20.

28)- BONNET (R.).-

The chemistry of the vitamin B12 group.

Chem.Rev., 1963, 63, 573.

29)- BRAY (R.C.), SHEMIN(D.).-

The biosynthesis of vitamin B12 .The derivation of the corrin structure from delta-aminolevulinic acid and the methyl group of methionine.

J.Biol.Chem., 1963, 238, 1501-8.

30)- BROTH (N.), REDFIELD (B.), WEISSBACH (H.).-

Reduction and alkylation of the cobamide prosthetic group in the enzymatic synthesis of methionine.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 18(1), 18-23.

31)- BUCHANAN (J.M.), ELFORD (H.L.), LONGHLIN (R.E.), McDOUGALL (B.M.), ROSENTHAL (S.).-

Role of vitamin B12 in methyl-transfer to homocysteine.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 112(2), 756-73.

32)- BULLERMAN (L.B.), BERRY (E.C.).-

Use of cheese whey for vitamin B12 production .I. Whey solids and yeast extract levels .II. Cobalt, precursor and aeration levels. III. Growth studies and dry-weight activity.
Appl. Microbiol., 1966, 14(3), 353-5 , 356-7, 358-60.

33)- BUNTOVA (E.), BARIA (S.).-

Vitamin B12 formation under different conditions of cultivation of Propionibacterium shermanii et P. freudenreichii.
Biologia (Bratislava), 1964, 19(5), 366-72 ; Chem. Abst., 1964, 61, 10003d.

34)- BURKHOLDER (P.R.).-

Determination of vitamin B12 with a mutant strain of Escherichia coli.
Science, 1951, 114, 459-60.

35)- CALET (C.), RERAT (A.).-

Nouvelle technique du dosage microbiologique de la vitamine B12 à l'aide de Escherichia coli .
Ann. Zootech., 1954, 3, 247-70.

36)- CALLENDER (S.T.E.), MALLETT (B.J.), SPRAY (G.H.), SHAW (G.E.).-

Anti-anaemia activity of faecal extract from pernicious anaemia patient.
Lancet, 1949, 257, 57 ; Nutr. Abst., 1949-50, 19, 710, n° 4109.

- 37)- CANNATA (J.J.B.), FOCESI (A.Jr.), MAZUMBER (R.), WARNER (R.C.),
OCHOA (S.).-

Metabolism of propionic acid in animal tissues.XII.
Properties of mammalian methyl-malonylcoenzyme A muta-
se.

J. Biol.Chem.,1965, 240 (8), 3249-57.

- 38)- CARTWRIGHT (G.E.), TATTING (B.), KURTH (D.); WINTROBE (M.M.).-

Experimental production of nutritional macrocytic
anemia in swine. 5. Hematologic manifestations of a
combined deficiency of vitamin B12 and pteroylgluta-
mic acid.

Blood, J. Hematol.,1952, 7,992-1004.

- 39)- CATRON (D.V.), RICHARDSON (D.), UNDERKOFER (L.A.), MADDOCK
(H.M.), FRIEDLAND (W.C.).-

Vitamin B12 requirement of weanling pigs.II.Performan-
ce of low levels of vitamin B12 and requirement for
optimum growth.

J. Nutrition, 1952, 47, 461-8.

- 40)- CHANARIN (I.).-

Urinary formiminoglutamic acid excretion (in rela-
tion to folic acid function).

Proc.Roy.Soc.Med.,1964, 57(5), 384-8; Chem.Abst.,1964,
61, 9819c.

- 41)- CHOW (B.F.), OKUDA (K.), McCOLLUM (E.B.).-

Vitamin B12 and the thyroid in reproduction of fe-
male rats.

J. Nutrition, 1961,74,319-23.

- 42)- CIMA (L.), MARASCHIN (B.).-

The role of the liver and kidneys in vitamin B12
metabolism in rats (en italien).

Arch.Ital.Sci.Farmacol.,1965, 15(1-2),75-6 ; Chem.
Abst., 1967, 66, 9284 h.

- 43)- CLARK (G.W.).-

A survey of the treatment of pernicious anaemia in
relapse: a) A comparison of the hematopoietic response
to liver extract and folic acid (L.casei factor), b)

Limitations of the reticulocyte response as a measure of antipernicious anaemia potency.

Amer.J.Med.Sci., 1948, 216, 71-7 ; Nutr.Abst., 1948-9, 18, 4931.

44)- COATES (M.E.), HARRISON (G.F.), KON (S.K.).-

The chick assay of vitamin B12 and the animal protein factor.

Analyst., 1951, 76, 146-9 ; Nutr.Abst., 1952, 21, 91 n° 392.

45)- COATES (M.E.), FORD (J.E.), HARRISON (G.F.), KON (S.K.), PORTER (J.W.G.).-

Vitamin B12 - like compounds 1 - Vitamin B12 activity for chicks and for different microorganisms of gut contents and faeces.

Brit.J. Nutrition, 1953, 7, 319-26.

46)- COATES (M.E.), DORAN (B.M.), HARRISON (G.F.).-

Activity of vitamin B12 coenzymes and antagonists in the chick and developing chick embryo.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 112(2), 837-43.

47)- COHN(E.J.), MINOT (G.R.), ALLES (G.A.), SALTER (W.T.).

The nature of the material in liver effective in pernicious anaemia .II.

J.Biol.Chem., 1928, 77, 325-58.

48)- CUTHBERTSON (W.F.J.), THORNTON (D.M.).-

The assay of vitamin B12. 7. Effect of dietary lactose and of the state of maternal nutrition on the growth response of the rat to vitamin B12 .

Brit.J. Nutrition, 1952, 6, 170-5.

49)- DAVIS (B.D.), MINGIOLI (E.S.).-

Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B12 .

J. Bact., 1950, 60, 17-28.

50)- DAVIS (R.L.), CHOW (B.F.).-

Content of radioactive vitamin B12 in the feces of rats fed ⁶⁰Co and aureomycin.

Proc.Soc.Expt.Biol.Med., 1951, 77, 218-21.

51)- DEMERS (J.M.), PLATONOW (N.).-

Recherches sur l'effet lipotrope de la vitamine B12 chez le caneton.

Canad.J. comp.Med., 1958, 22, 190-6 ; Nutr.Abst., 1959, 29, n° 453.

52)- DICKERMAN (H.), REDFIELD (B.G.), BIERI (J.G.), WEISSBACH (H.).-

The role of vitamin B12 in methionine biosynthesis in avian liver.

J. Biol.Chem., 1964, 239(8), 2545-52.

53)- DOLPHIN (D.), JOHNSON (A.W.), RODRIGO (R.).-

Some reactions of the vitamin B12 coenzyme and its alkyl analogs.

Ann. N.Y.Acad.Sci., 1964, 112(2), 590-600.

54)- DONG-PAL (K.), BAUN (K.), UNG-YUN (R.).-

The distribution of orally administered vitamin B12-⁶⁰Co in rats.

New Med.J. , 1964, 7 (2), 79-82 ; Chem.Abst., 1964, 60, 12495 h.

55)- DOWNING (M.), ADAMS (A.), HELLENGA (L.).-

Enzymic conversion of ribonucleotides to deoxynucleotides .

Biochim.Biophys.Acta, 1965, 108(2), 233-42.

56)- DRYDEN (L.P.), HARTMAN (A.M.), CARY (C.A.).-

The effect of vitamin B12 deficiency upon the survival of young born to rats fed purified casein rations.

J. Nutrition, 1952, 46, 281-97.

57)- DRYDEN (L.P.), HARTMAN (A.M.), BRYANT (M.P.), ROBINSON (I.M.), MOORE (L.A.).-

Production of vitamin B12 and vitamin B12 analogues by pure cultures of ruminal bacteria.

Nature, 1962, 195, 201-2.

58)- EDWARDS (H.M.Jr), GILLIS (M.B.).-

A chromic oxyde balance method for determining phosphate availability.

Poultry Sci., 1959, 38, 569-74; Nutr.Abst., 1960, 30, n° 1394.

59)- EMERSON (G.A.).-

Growth promoting activity of vitamin B12 in rats receiving thyroid substance.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1949, 70, 392-4 ; Nutr.Abst., 1949-50, 19, 343, n° 2105.

60)- ERIDANI (S.), SILVESTRINI (R.), TAGLIORETTI (D.).-

Inhibition of the incorporation of vitamin B12 in rat tissue by saturation with an antivitamin.
Autoradiographic study (en italien).
Atti Accad.Med. Lombarda, 1961, 16, 95-8 ; Chem.Abst., 1963, 58, 9455a.

61)- ERWIN (E.S.), MARCO (G.J.), EMERY (E.M.).-

Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography.
J. Dairy Sci., 1961, 44, 1768-71 ; Nutr.Abst., 1962, 32, 1704.

62)- EVANS (H.J.), KLIEWER (M.).-

Vitamin B12 compounds in relation to the requirements of cobalt for higher plants and nitrogen fixing organisms.
Ann.N.Y. Acad. Sci., 1964, 112(2), 735-55 ; Chem.Abst., 1964, 61, 7394h.

63)- FORD (J.E.), HOLDSWORTH (E.S.), KON (S.K.), PORTER (J.W.G.).-

Occurrence of the various vitamin B12 active compounds.
Nature, 1953, 171, 148-9 , 149 -150, 150-1.

64)- FORD (J.E.).-

The microbiological assay of vitamin B12. The specificity of the requirement of Ochromonas malhamensis .
Brit.J. Nutrition, 1953, 7, 299-306.

65)- FOSTER (M.A.), DILWORTH (M.J.), WOODS (D.D.).-

Cobalamin and the synthesis of methionine by Escherichia coli.
Nature, 1964, 201, 39-42.

66)- FOSTER (M.A.), TEJERINA (G.), GUEST (J.R.), WOODS (D.D.).-

Two enzymic mechanisms for the methylation of homocysteine by extracts of Escherichia coli.
Biochem. J., 1964, 92(3), 476-88.

67)- FREY (P.A.), ABELES (R.H.).-

The role of the B12 coenzyme in the conversion of 1,2-propanediol to propionaldehyde.
J. Biol.Chem., 1966, 241(11), 2732-3.

68)- FREY (P.A.), ESSENBERG (M.K.), ABELES (R.H.).-

The mechanism of hydrogen transfer in the cobamide coenzyme-dependent dioldehydrase reaction.
J. Biol.Chem., 1967, 242 (22), 5369-77 ; Chem.Abst., 1968, 68, 516 b.

69)- FRIES (L.).-

Vitamin B12 in Pisum sativum.
Physiol.Plantarum, 1961, 15, 566-71; Chem.Abst., 1963, 58, 751 h.

70)- FROST (D.V.), FRICKE (H.H.), SPRUTH (H.C.).-

Rat growth assay for vitamin B12.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1949, 72, 102-6; Nutr.Abst., 1949-50, 19, 4837.

71)- FROST (D.V.), FRICKE (H.H.), SPRUTH (H.C.).-

Rat growth assay for vitamin B12. Correspondence with collaborative microbiological assay results on U.S.P. liver extracts.
J. Nutrition, 1953, 49, 107-20.

72)- GIROUD (A.), LEFEBVRES (J.).-

Deficiences nutritionnelles tératogènes.
Ann. Nutr.Alim., 1957, 11, 15-49.

73)- GREENE (R.D.), BROOK (A.J.), McCORMACK (R.B.).-

Some conditions which affect the assay of vitamin B12 with Lactobacillus lactis Dorner.
J. Biol.Chem., 1949, 178, 999-1000.

74)- GUEST (J.R.), KOSTER (M.A.), WOODS (D.D.).-

Methyl derivatives of folic acid as intermediates in the methylation of homocysteine by Escherichia coli.
Biochem. J., 1964, 92, 488-96.

75)- HADEN (R.L.), BORTZ (D.W.).-

Treatment of idiopathic pernicious anaemia.
J. Amer. Med. Assoc., 1948, 138, 870-3 ; Nutr. Abst., 1948-9
18, 886, n° 5030.

76)- HALBROOK (E.R.), CORDS (F.), WINTER (A.R.), SUTTON (T.S.).-

Vitamin B12 production by microorganisms isolated from poultry-house litter and droppings.
J. Nutrition, 1950, 41, 555-63.

77)- HEINRICH (H.C.), PFAU (A.A.).-

Mit Hilfe eines Gesamtkörper. Radioaktivitäts-Detektors durchgeführte Untersuchungen zur Resorption, biologischen Halbwertszeit und Umsatzrate der vitamin B12 in menschlichen Organismus.
Vitamin B12 und Intrinsic Factor. 2. Europäisches Symposium, Hamburg, 1961, 351-81, Ed. F. Enke, Stuttgart.

78)- HEINRICH (H.C.), GABBE (E.E.).-

Metabolism of the vitamin B12 -coenzyme in rats and man.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 112, 871-903.

79)- HENDERSON (R.F.), DINNING (J.S.).-

Vitamin B12 and thymine methyl biogenesis.
Feder. Proc., 1963, 22(2), 203.-

80)- HENDERSON (R.F.), DINNING (J.S.).-

Vitamin B12 and DNA biogenesis.
J. Nutrition, 1963, 81(4), 372-8.

81)- HERBERT (V.), STREIFF (R.), SULLIVAN (L.), McGEER (P.).-

Deranged purine metabolism manifested by aminoimidazolecarboxamide excretion in megaloblastic anaemias, haemolytic anaemia and liver disease.
Lancet, 1964, ii, 45-6; Nutr. Abstr., 1965, 35, 179, n°1020.

82)- HERBERT (V.), CASTLE (W.B.).-

Intrinsic factor.

New England J. Med., 1964, 270(22), 1181-5; Bull. Sick,
1964, 25-16-36549.

83)- HEYSSEL (R.M.), BOZIAN (R.C.), DARBY(W.J.), BELL (M.C.).-

Vitamin B12 turnover in man. The assimilation of
vitamin B12 from natural foodstuff by man and esti-
mates of minimal daily dietary requirements.

Amer.J. Clin. Nutr., 1966, 18(3), 176-84.

84)- HODGKIN (D.C.).-

Vitamin B12 and the porphyrins.

Feder.Proc., U.S.A., 1964, 23, n° 3, part. 1, 592-8.

85)- HOGENKAMP (H.P.C.).-

Structure and chemical reactions of the cobamide
coenzymes.

Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 552-84.

86)- HOGENKAMP (H.P.C.).-

The photolysis of methyl cobalamin.

Biochemistry, 1966, 5(2), 417-22.

87)- HOGENKAMP (H.P.C.).-

Recent development in the chemistry of B12 coenzymes.

Feder.Proc., 1966, 25 (6), 1623-7.

88)- HSU (J.M.), STERN (J.R.), McGINNIS (J.).-

Effect of vitamin B12 deficiency on chick plasma
proteins.

Arch.Biochem.Biophys., 1953, 42, 54-60.

89)- HUENNEKENS (F.M.).-

Biochemical functions and interrelationships of
Folic Acid and Vitamin B12.

Progress in hematology, 1966, 5, 83-104; Chem.Abst.,
1967, 66, 82349 v.

90)- HUTNER (S.H.), PROVASOLI (L.), FILFUS (J).-

Nutrition of some phagotrophic fresh-water chrysomoids.

Ann. N.Y. Acad.Sci., 1953, 55, 852-62.

91)- JACOBSON (S.D.), BERMAN (L.), AXELROD (A.R.), VONDERHEIDE (E.C.)

Folic acid therapy. Its effect as observed in two patients with pernicious anaemia and neurologic symptoms.

J. Amer.Med.Assoc., 1948, 137, 825-7 ; Nutr.Abst., 1948-9 18, 639, n° 3594.

92)- JACQUOT (R.).-

Compétition alimentaire entre la mère et l'enfant. Chronologie des besoins.

Ann. Nutr.Alim., 1953, 7, 39-57.

93)- JACQUOT (R.).-

Quelques aspects nutritionnels de la gestation .
Conférence Palais de la Découverte (1959).

Série A, n° 253, Ed. Palais Découverte, Paris.

94)- JAENICKE (L.).-

Vitamin and coenzyme function : vitamin B12 and folic acid.

Ann. Rev. Biochem., 1964, 33, 287-312.

95)- JERZY-GLASS (G.B.), HO LEE (D.), SKEGGS (H.R.), STANLEY (J.L.).-

Hydroxocobalamin III. Long-acting effects of massive parenteral doses on vitamin B12 blood levels in man.

J. Amer.Med.Assoc., 1963, 183, 425-9 ; Nut.Abst., 1963, 33, 1117, n° 6735.

96)- JERZY-GLASS (G.B.).-

Gastric intrinsic factor and its function in the metabolism of vitamin B12.

Physiol.Rev., 1963, 43, 529-849.

97)- JOHNSON (B.C.).-

Vitamin B12 in animal nutrition.

Vitamin B12 und Intrinsic Factor. I. Europaisches Symposium, Hamburg, 1956, 133-55, Ed.F. Enke, Stuttgart; Bull.Sign., 1958, 19, 122373.

98)- INGRAHAM (L.L.).-

B12 coenzymes : biological Grignard reagents.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 713-20.

99)- KAHN (S.B.), WILLIAMS (W.J.), BARNES (L.A.), YOUNG (D.),
SHAFFER (B.), VIVACQUA (R.J.), BEAUPRE (E.M.).-

Methylmalonic acid excretion, a sensitive indicator
of vitamin B12 deficiency in man.
J. Lab.Clin.Med., 1965, 66 (1), 75-83.

100)- KAIPAINEN (W.J.).-

On the antitoxic effect of vitamin B12.
Acta pathol.microbiol. scand., 1962, 55, 35-8; Nutr.
Abst., 1963, 33, 76, n° 431.

101)- KALEJA (E.).-

Biosynthesis of vitamin B12 in the intestinal tract
of rabbits (en letton, résumé en russe).
Latvijas P.S.R. Zinatnie Akad Vestis, 1957, 7, 89-91;
Chem.Abst., 1958, 52, 3918 g.

102)- KARLIN (R.).-

Données préliminaires sur une poudre alimentaire ri-
che en vitamines, préparée après culture, sur du lac-
to-sérum, des bactéries vitaminogènes.
Ann. Nutr.Alim., 1967, 21, (1), 13-15.-

103)- KASANEN (A.), LINDGREEN (I.), SALMI(H.A.).-

The accumulation and localization of radioactive ⁶⁰Co-
balt in rat kidney.
Acta Physiol.scand., 1964, 61(4), 376-9.

104)- KERWAR (S.S.), MANGUM (J.H.), SCRIMGEOUR (K.G.), HUENNEKENS
(F.M.).-

Function of methylcobalamin in methionine synthesis.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1964, 15(4), 377-82.

105)- KLIEWER (M.), EVANS (H.J.).-

Cobamide coenzyme contents of soybean nodules and
nitrogen-fixing bacteria in relation to physiological
condition.
Plant Physiol., 1963, 38(1), 99-104; Chem.Abst., 1963,

58, 10513 d.

106)- KOCH-WESER (D.), SZANTO (P.B.), FARBER (E.), POPPER (H.).-

Further investigation on the effect of vitamin B12 concentrate upon hepatic injury produced by carbon tetrachloride.

Lab.Clin. Med., 1950, 36, 694-704; Nutr.Abst., 1950-51, 20, 900, n° 5103.

107)- KON(S.K.), PORTER (J.W.G.).-

The intestinal synthesis of vitamins in the Ruminant. Vitam.Horm., 1954, 12, 53-68.

108)- KONOVA (I.V.), LISENKOVA (L.L.).-

Biosynthesis of vitamins of the B12 group by Actinomyces olivaceus on synthetic medium (en russe)

Izv.Akad.Nauk.SSSR, Ser.Biol., 1965, 30(5), 760-1;

Chem.Abst., 1966, 64, 1058 g.

109)- KULWICH (R.), STRUGLIA (L.), PEARSON (P.B.).-

The effect of coprophagy on the excretion of B vitamins by the rabbit.

J. Nutrition, 1953, 49, 639-45.

110)- LASCELLES (J.), CROSS (M.J.).-

The function of vitamin B12 in microorganisms.

Biochem.Soc.Symp. n° 13 : "The Biochem. of vitamine B12", Cambridge Univ.Press, 1955, 109-23.

111)- LESTER SMITH (E.), PARKER (L.F.J.).-

Purification of anti-pernicious anaemia factor.

Biochem. J., 1948, 43, viii-i x.

112)- LESTER SMITH (E.).-

Isolation and chemistry of vitamin B12.

Biochemical Society Symposia n° 13. "The biochemistry of vitamin B12", Cambridge, Univ.Press, 1955, 3-16.

113)- LESTER SMITH (E.).-

Vitamin B12, Methuen, London, IIIème édition, 1965.

114)- LILLIE (R.J.), DENTON (C.A.), BIRD (H.R.).-

Relation of vitamin B12 to the growth factor present in cow manure.

J. Biol.Chem., 1948, 176, 1477-8

115)- LILLIE (R.J.), OLSEN (M.W.), BIRD (H.R.).-

Role of vitamin B12 in reproduction of poultry.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1949, 72, 598-602.

116)- LING (C.T.), CHOW (B.F.).-

Effect of vitamin B12 on the body composition of rats.

J. Biol.Chem., 1952, 198, 439-44.

117)- LING (C.T.), CHOW (B.F.).-

The effect of vitamin B12 on the levels of soluble sulphhydryl compounds in blood.

J.Biol.Chem., 1953, 202, 445-56.

118)- LING (C.T.), CHOW (B.F.).-

The influence of vitamin B12 on carbohydrate and lipide metabolism.

J. Biol.Chem., 1954, 206, 797-805.

119)- LOUGHLIN (R.E.), ELFORD (H.L.), BUCHANAN (J.M.).-

Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. VII Isolation of a cobalamin containing transmethy-lase (5- methyltetrahydrofolate -homocystéine) from mammalian liver.

J. Biol.Chem., 1964, 239(9), 2888-95.

120)- MANSON (L.A.).-

Vitamin B12 and deoxyribose synthesis.

Vitamin B12 and Intrinsic Factor, 2. Europaisches Sympo-sion, Hambourg, 1961, 191-6, Ed. F. Enke, Stuttgart.

121)- MARSTON (H.R.).-

Cobalt, copper and molybdenum in the nutrition of animals and plants.

Physiol.Rev., 1952, 32, 66-121.

122)- MATTHEWS (D.M.).-

The estimation of serum vitamin B12 using Lactobacillus leichmanii .
Clin.Sci.,1962, 22(1), 101-11.

123)- MENZIES (R.C.), CROSSEN (P.E.), FITZGERALD (P.H.),GUNZ (F.W.).

Cytogenic and cytochemical studies on marrow cells in vitamin B12 folate deficiency.
Blood, J. Hematol.,1966, 28(4), 581-94; Nutr.Abst., 1967, 37,873, n° 5071.

124)- MERZBACH (D.), GROSSOWICZ (N.).-

Absorption of vitamin B12 from the large intestine of rats.
J. Nutrition, 1965, 87(1), 41-51.

125)- MICKELSEN (O.).-

Intestinal synthesis of vitamins in the Nonruminant..
Vitam. Horm.,1956, 14, 1-95.

126)- MINOT (G.R.), MURPHY (W.P.).-

Treatment of pernicious anaemia by a special diet.
J. Amer.Med.Assoc.,1926, 87,470-6.

127)- MOLLIN (D.L.).-

Relapse of pernicious anaemia during maintenance therapy with folic acid .
LANCET, 1948, 255, 928-30; Nutr.Abst.,1948-49,18, 873, n° 4929.

128)- MOLLIN (D.L.), WATERS (A.H.), HARRIS (E.).-

Clinical aspects of the metabolic interrelationships between folic acid and vitamin B12.
Vitamin B12 und Intrinsic Factor 2. Europaisches Symposium, Hamburg ,1961,737-55. Ed.F.Enke, Stuttgart.

129)- MORCZEK (A.), SCHMIDT (W.).-

Influence of vitamin B12 and folic acid on radiation syndrome of whole-body irradiated rats (en allemand).
Radiobiol.Radiotherap.,1966,7,487-94; Chem.Abst., 1967, 67, 70966b.

130)- MORGAN (T.B.), GREGORY (M.E.), KON (S.K.), PORTER (J.W.G.).-

Coprophagy and vitamin B12 in the rat.
Brit.J.Nutr.,1964, 18(4), 595-602.

131)- NERONOVA (N.M.), IERUSALIMSKIJ (N.D.), ANCHUROVA (A.I.).-

Production de vitamine B12 par les bactéries propioniques en rapport avec les conditions de culture (en russe).

Mikrobiologija SSSR, 1962, 31(2) 203-8 ; Nutr.Abst., 1962, 32, 5344 ; Chem.Abst., 57, 8996e.

132)- NEUJAHR (H.Y.).-

Vitamins in ~~sewage~~ sludge .X. Production of vitamin B12 by sulfate-reducing bacteria.

Acta Chem.Scand., 1959, 13, 1960-76 ; Chem.Abst., 56, 14716 d .

133)- NEUJAHR (H.Y.), FRIES (L.).-

Occurrence of light sensitive corrinoïds in axenic cultures of unicellular algae

Acta Chem.Scand., 1966, 20 n°2, 347-60.

134)- NEWBERNE (P.M.), O'DELL(B.L.).-

Pathology of vitamin B12 deficiency in infant rats.
J. Nutrition, 1959, 68, 343-57.

135)- NEWBERNE (P.M.), O'DELL(B.L.).-

Hematology in vitamin B12 deficient newborn rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1959, 100, 335-7.

136)- NEWBERNE (P.M.).-

Effect of vitamin B12 deficiency and excess on the embryonic development of the rat.

Amer.J.Veter.Res., 1963, 24 (103), 1304-12; Bull.Sign., 25-16- 20717.

137)- NEWBERNE (P.M.), YOUNG (V.R.).-

Effect of diets marginal in methionine and choline with and without vitamin B12 on rat liver and kidney.
J. Nutrition, 1966, 89(1), 69-74.

138)- N'GUYEN CÔNG (H.), VALENCIA (R.).-

A propos du dosage microbiologique de la vitamine B12 par Ochromonas malhamensis.

Bull.Soc.Chim.Biol., 1964, 46, 751-4.

139)- NOBLE (R.C.), MOORE (J.H.).-

The lipid metabolism of the normal and vitamin B12-
deficient chick embryo.
Biochem.J., 1965, 95(1), 144-9.

140)- OGINSKY (E.L.).-

Vitamin B12 and Methionine formation.
Arch.Biochem.Biophys., 1950, 26, 327-9.

141)- OKUDA (K.).-

Relation between intake of vitamin B12 and its sto-
rage by the kidney in the rat.
J. Nutrition, 1962, 77(2), 131-6.

142)- OKUDA (K.), TAKEDATSU (H.).-

Absorption of vitamin B12 in a rectal suppository.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1966, 123(2), 504-6.

143)- OLCESE (O.), COUCH (M.W.), QUISENBERRY (J.H.), PEARSON (P.B.).-

Congenital anomalies in the chick due to vitamin B12
deficiency.
J. Nutrition, 1950, 41, 423-31.

144)- OTT (W.H.), RICKES (E.L.), WOOD (T.R.).-

Activity of crystalline vitamin B12 for chick growth.
J. Biol.Chem., 1948, 174, 1047-8.

145)- PERUGINI(S.), SILINGARDI (V.), ZAMPORI(O.).-

Nuclear content of DNA and histone in megaloblasts
of pernicious anaemia.
Haematologica (Pavia), 1961, 46(6), 565-80; Chem.Abst.,
61, 7494 c.

146)- POSTON (J.M.), KURATOMI(K.), STADTMAN (E.R.).-

The conversion of carbon dioxide to acetate. I. The
use of cobalt-methylcobalamin as a source of methyl
groups for the synthesis of acetate by cell-free
extracts of Clostridium thermoaceticum.
J.Biol.Chem., 1966, 241(18), 4209-16.

147)- RAIBAUD (P.), VALENCIA (R.), DICKINSON(A.B.), N'GUYEN CONG (H.)

Biosynthèse in vitro de la vitamine B12 et autres co-
balamines par des souches de bactéries isolées du tu-
be digestif du Rat.
C.R.Acad.Sci., Paris, 1965, 260, 5952-5.

- 148)- RAIBAUD (P.), DICKINSON (A.B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.),
MOCQUOT (G.).-

La microflore du tube digestif du Rat. I. Techniques
d'étude et milieux de culture proposés.
Ann.Inst.Pasteur, 1966, 110,568-90

- 149)- RAIBAUD (P.), DICKINSON (A.B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.),
MOCQUOT (G.).-

La microflore du tube digestif du Rat. II.Dénombrement
de différents genres microbiens dans l'estomac
et l'intestin de rats conventionnels.Variations quantita-
tives individuelles et en fonction de l'âge.
Ann. Inst.Pasteur, 1966, 110,861-76.

- 150)- RAIBAUD (P.), DICKINSON (A.B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.),
MOCQUOT (G.).-

La microflore du tube digestif du Rat.IV. Implantation
contrôlée chez le Rat gnotobiotique de différents genres
microbiens isolés du Rat conventionnel.
Ann.Inst.Pasteur, 1966, 111,193-210.

- 151)- REGISTER (U.D.), RUEGAMER (W.R.), ELVENJEM(C.A.).-

An improved assay for a growth factor in liver ex-
tracts.
J.Biol.Chem.,1949,177,129-34.

- 152)- REICHARD (P.).-

Formation of deoxyguanosine 5'-phosphate from guano-
sine 5'-phosphate with enzymes from chick embryos.
Biochim.Biophys.Acta, 1960,41, 368-9.

- 153)- RETEY(J.),COY(U.), LYNEN (F.).-

Mechanism of the coenzyme B12 - dependent isomerisa-
tion of (r)- methylmalonyl CoA to succinyl CoA.
Biochem.Biophys.Res.Comm.,1966, 22(3),274-7.

- 154)- REYNIERS (J.A.).-

Design and operation of apparatus for rearing germ-
free animals.
Ann. N.Y. Acad.Sci.,1959,78,47-79.

- 155)- RICHARDSON (L.R.), DE MOTTIER (J.).-

Inadequate maternal nutrition and hydrocephalus in
infant rats.
Science, 1947, 106,644.

- 156)- RICKES (E.L.), BRINK (N.G.), KONIUSZY (F.R.), WOOD (T.R.),
FOLKERS (K.).-

Crystalline B12.

Science, 1948, 107, 396-7.

- 157)- RICKES (E.L.), BRINK (N.G.), KONIUSZY (F.R.), WOOD (T.R.),
FOLKERS (K.).-

Comparative data on vitamin B12 from liver and from
a new source Streptomyces griseus.

Science, 1948, 108, 634-5.

- 158)- ROBBLE (A.R.), NICHOL (C.A.), CRAVENS (W.N.), ELVEHJEM (C.A.),
HALPIN (J.G.).-

Some properties of an unidentified chick-growth fac-
tor found in condensed fish-solubles.

J. Biol. Chem., 1948, 173, 117-22.

- 159)- RUBIN (M.), BIRD (H.R.), ROTHCHILD (I.).-

A growth promoting factor for chicks in the faeces
of hens.

Poultry Sci., 1946, 25, 256-8.

- 160)- RUBIN (M.), BIRD (H.R.).-

A chick-growth factor in cow manure. IV. Methods
of drying manure.

Poultry Sci., 1947, 26, 439-41.

- 161)- SACQUET (E.).-

Service des animaux axéniques. C.N.R.S. 91-Gif-sur-
Yvette.

Communication personnelle.

- 162)- SANFORD (K.K.), DUPREE (L.T.).-

Activity of vitamin B12 in mammalian cells in tissue
culture.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 112(2), 823-30.

- 163)- SATTLER (K.).-

Einige Aspekte zur Biosynthese von vitamin B12 bei
der biologischen Reinigung von Industrie abwässern.
II. Der Einfluss bestimmter Milieubedingungen auf das
Verhältnis zwischen Hefen und Bakterien und die Bio-
synthese von vitamin B12.

Z. Allg. Mikrobiol. Dtsch., 1963, 3(1), 68-75.

164)- SCHULTZE (M.O.).-

Nutritional value of plant materials. I. Growth of rats on purified rations containing soybean protein. J. Nutrition, 1950, 41, 103-13.

165)- SCHWEIGERT (B.S.), SCHEID (H.E.), DOWNING (M.).-

Liver changes in vitamin B12 and riboflavin-deficient rats before and after partial hepatectomy. Amer.J.Physiol., 1954, 178, 338-40.

166)- SHEMIN (D.), BRAY (R.C.).-

The biosynthesis of the corrin structure of vitamin B12 .
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 615-21; Chem.Abst., 1964, 61, 6082d.

167)- SHORB (M.S.).-

Activity of vitamin B12 for the growth of Lactobacillus lactis.
Science, 1948, 107, 397-8.

168)- SKEGGS (H.R.), HANUS (E.J.), McCAULEY (A.B.), RIZZO (V.J.).-

Hydroxocobalamin : physiological retention in the dog. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med, 1960, 105, 518-21.

169)- SKEGGS (H.R.).-

Microbiological assay of vitamin B12.
Methods.Biochem.Anal., 1962, 14, 53-62; Chem.Abstr., 1966, 65, 10953 a.

170)- SMILEY (K.L.), SOBOLOV (M.).-

Some properties of the glycerol dehydrase system from a species of Lactobacillus.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 706-12.

171)- SPIVEY FOX (M.R.), LUDWIG (W.J.).-

Excretion of formiminoglutamic acid as an index of vitamin B12, folic acid and methionine deficiencies. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1961, 108, 703-6.

172)- STEFFENS (W.), MENKE (K.H.).-

Cobalt and vitamin B12 metabolism. III. Coprophagy in chickens after the administration of ⁶⁰Co **C12** (en allemand).
Atompraxis, 1964, 10, 152-7; Chem.Abst., 1967, 66, 9072c.

173)- STONE (R.E.), SPIES (T.D.).-

Vitamin B12 and subacute combined degeneration of the spinal cord.

Intern.Ztschr.Vitaminforsch., 1948, 20, 228-33.

174)- STOKSTAD (E.L.R.), PAGE (A.), PIERCE (J.), FRANKLIN (A.L.), JUKES (T.H.), HEINLE (R.W.), EPSTEIN (M.), WELCH (A.D.).-

Activity of microbial animal protein factor concentrates in pernicious anaemia.

J. Lab.Clin.Med., 1948, 33, 860-4; Nutr.Abst., 1948-9, 18, n°3680.

175)- STOKSTAD (E.L.R.), WEBB (R.E.), SHAH (E.).-

Effect of vitamin B12 and folic acid on the metabolism of formiminoglutamate, formate and propionate in the rat.

J. Nutrition, 1966, 88(2), 225-32.

176)- STOKSTAD (E.L.R.), KOCH (J.).-

Folic acid metabolism.

Physiol.Rev., 1967, 47(1), 83-116.

177)- SURE (B.), EASTERLING (L.).-

The protective action of vitamin B12 against the toxicity of DL- thyroxine.

J. Nutrition, 1950, 42, 221-5.

178)- TERROINE (T.).-

Biochimie de la tératogénèse par avitaminose et hypervitaminose.

Ann. Nutr.Alim., 1969, 23 n°5, B41-B79.

179)- TREXLER (P.C.).-

The use of plastics in the design of isolator systems.

Ann. N.Y. Acad.Sci., 1959, 78, 29-36.

180)- VALDMANIS (A.).-

Methane fermented waste liquors as a source of vitamin B12 in animal nutrition.

Vitamin.Resurvey i ikh Ispol'n., Akad.Nauk.SSSR.Inst. Biokhim., Sb n° 6, 1963, 19-25; Chem.Abstr., 60, 7210 c.

181)- VALENCIA (R.).-

Quelques aspects de la synthèse microbiologique des cobalamines et de la vitamine B12 .

Ann. Nutr.Alim., 1965, 19(1), C 679-87.

182)- VALENCIA (R.), BLUM (J.Cl)., JACQUOT (R.).-

Influence de la méthionine supplémentant la farine de soja sur la biosynthèse de vitamine B12 par Streptomyces olivaceus.

C.R.Acad.Sci., Paris, 1962, 225 , 2288-90.

183)- VALENCIA (R.).-

Influence de divers corps méthylés supplémentant la farine de soja sur la biosynthèse des cobalamines totales et de la vitamine B12 par Streptomyces olivaceus.

C.R.Acad.Sci., Paris, 1963, 257, 3245-6.

184)- VALENCIA (R.), RAIBAUD (P.).-

Influence des conditions de culture sur la production de cobalamines par les bactéries de la flore intestinale du rat et sur leur fermentation.

Ann.Nutr.Alim., 1968, 22(1), 77-81.

185)- VALU (J.A.).-

Survival of Lactobacillus leichmanii in relation to vitamin B12 assays.

Appl.Microbiol.,U.S.A., 1965, 13(3), 486-90.

186)- VAN EENAEME (C.C.), BIENFAIT (J.M.), LAMBOT (O.).-

La détermination quantitative des acides gras volatils dans le liquide du rumen par chromatographie en phase gazeuse.

Ann. Med.Veter., 1963, 109(8), 569-84; Chem.Abst., 1966, 65, 9317d.

187)- VENKATARAMAN (P.R.), BARNUM (C.P.).-

Incorporation of Radiophosphorous into Nucleic acids of vitamin B12 - deficient Rat tissues.

Biochem. J., 1957, 66, 694-9.

188)- VENKATARAMAN (S.), NETRAWALI (M.S.), SREENIVASAN (A.).-

Role of vitamin B12 in the metabolism of Euglena gracilis var. Bacillaris.

Biochem. J., 1965, 96(2), 552-6.

189)- WAGNER (M.).-

Détermination of germ-free status .
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1959, 78, 89-101.

190)- WAGLE (S.R.), MEHTA (R.), JOHNSON (B.C.).-

Vitamin B12 and protein biosynthesis.IV.In vivo and
in vitro studies.
J. Biol.Chem., 1958, 230, 137-47.

191)- WAGLE (S.R.), VAUGHAN (D.A.), MISTRY (S.P.), JOHNSON (B.C.).-

Vitamin B12 and nucleic acid biosynthesis.
J. Biol.Chem., 1958, 230, 917-21.

192)- WEBER (M.), OSTROWSKI (W.), STACHURSKA (B.).-

Influence of vitamin B12 and its coenzyme upon in-
corporation in vivo of amino-acids into tissue pro-
tein in rats.
Bull.Acad.Polon.Sci., Série Sci.Biol., 1963, 11, n°1,
13-18.

193)- WEISSBACH (H.), REDFIELD (B.G.), DICKERMAN (H.).-

Effect of vitamin B12 analogues on methionine forma-
tion from N⁵- methyltetrahydrofolic acid.
J. Biol.Chem., 1964, 239, 146-8.

194)- WEISSBACH (H.), TAYLOR (R.).-

Role of vitamin B12 in methionine synthesis.
Feder.Proc., 1966, 25(6), 1649-56.

195)- WILSON (J.), LANGMAN (M.J.S.).-

Relation of sub-acute combined degeneration of the
cord to vitamin B12 deficiency..
Nature, 1966, 212, 787-9.

196)- WOOD (H.G.), KELLERMAYER (R.W.), STJERNHOLM (R.), ALLEN (S.H.G)

Metabolism of methylmalonyl-CoA and the role of bio-
tin and B12 coenzymes.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 1964, 112(2), 661-79.

197)- WOOD (J.M.), WOLFE (R.S.).-

Components required for the formation of methane
from methylcobalamin by extracts of Methanobacillus
omelianskii.
J. Bacteriol., 1966, 92 n° 3, 696-700.

198)- WOOD (W.A.).-

Fermentation of carbohydrates and related compounds.
in The Bacteria .II. Metabolism, 1961, 59-149.
Acad. Press, New York-London

199)- WOODARD (J.C.), NEWBERNE (P.M.).-

Relation of vitamin B12 and one-carbon metabolism to
hydrocephalus in the rat.
J. Nutrition, 1966, 88(4), 375-81.

200)- WONG (W.T.), SCHWEIGERT (B.S.).-

Role of vitamin B12 in Nucleic acid metabolism.
J. Nutrition, 1956, 58, 231-42.

201)- WRIGHT (L.D.), SKEGGS (H.R.), HUFF (J.W.).-

The ability of thymidine to replace vitamin B12 as
a growth factor for certain lactobacilli.
J. Biol. Chem., 1948, 175, 475-6.

202)- YAMADA (R.H.), KATO (T.), SHIMIZU (S.), FUKUI (S.).-

Properties and photochemical decomposition of some
hydroxyalkyl derivatives of cobalamins.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 97, 353-6.

203)- YAMADA (R.), KATO (T.), SHIMIZU (S.), FUKUI (S.).-

Reduction of cobalt atom of corrinoid compounds by
alkali treatment.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 117(1), 13-21.

204)- YAMADA (R.), SHIMIZU (S.), FUKUI (S.).-

Formation of vitamin B12 by anaerobic photolysis of
Coalkylcobalamins..
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 124(1), 197-200.

205)- YESAIR (D.W.), McOSKER (D.E.), DANIEL (L.J.).-

The effect of vitamin B12 on the synthesis of phos-
pholipids and sphingosine in the developping chick
embryo.
Arch. Biochem. Biophys., 1959, 79, 168-76.

SYNTHESE DES COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE
 ET
AVITAMINOSE B12 CHEZ LE RAT NORMAL ET LE RAT AXENIQUE

*
 * *

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION - =====	1
La vitamine B12 et la nomenclature des cobalamines	2
Sources de cobalamines et synthèse par les bactéries	4
Fonctions métaboliques des cobalamines	6
Rôle de la vitamine B12; carence et besoin chez l'animal supérieur	8
Objet et conditions de notre étude	12
- PREMIERE PARTIE -	
<u>PRODUCTION DE COBALAMINES PAR LA FLORE INTESTINALE</u> <u>DU RAT</u>	
	15
I - METHODES - =====	16
1)- <u>Prélèvement des échantillons de fèces et des contenus intestinaux pour examen ou dosages</u>	16
2)- <u>Isolement des souches</u>	16
3)- <u>Culture des souches</u>	17
4)- <u>Extraction des cobalamines des milieux de culture</u>	18
-Nécessité des substances réductrices	18
-Mode opératoire	19
5)- <u>Dosage microbiologique des cobalamines</u>	19
-Dosage des cobalamines totales avec <u>Escherichia coli</u>	20
-Dosage de la vitamine B12 avec <u>Ochromonas malhanensis</u>	21

6)- <u>Identification et dosage approché des acides gras volatils produits dans les cultures des souches</u>	23
- <u>Préparation des échantillons</u>	23
- <u>Conditions expérimentales</u>	24
II - <u>POUVOIR DE SYNTHÈSE DE LA FLORE INTESTINALE</u> -	26
A)- <u>Synthèse des cobalamines in vitro par des souches isolées de la microflore intestinale du Rat</u> .	
1)- <u>Culture des souches pures dans un milieu d'entretien</u>	26
a)- <u>Genres producteurs de cobalamines</u>	27
b)- <u>Genres peu ou non producteurs de cobalamines</u>	29
2)- <u>Influence de certaines conditions de culture et types de fermentations</u> ..	31
a)- <u>Etude des souches anaérobies facultatives</u>	31
b)- <u>Production d'acides gras volatils. Rapport avec la biosynthèse des cobalamines</u>	33
- <u>Comparaison des synthèses d'acides gras et de cobalamines</u>	36
c)- <u>Influence du substrat énergétique</u>	39
- <u>Acide lactique</u>	40
- <u>Acide pyruvique</u>	41
- <u>Effet des acides lactique et pyruvique sur la croissance cellulaire</u>	42
d)- <u>Effet d'un donneur de méthyle : la méthionine</u>	43
3)- <u>Cultures mixtes de genres microbiens différents</u>	44
B)- <u>Synthèse des cobalamines in vivo par la microflore du Rat et effets des régimes carencés</u> .	
1)- <u>Les populations bactériennes du contenu caecal suivant le régime</u>	47

2)- <u>Cobalamines et vitamine B12 du contenu</u> <u>caecal suivant le régime</u>	49
--	----

III - DISCUSSION SUR LES BIOSYNTHESES DES COBALAMINES

ET LEUR ROLE	50
--------------------	----

1)- <u>Etudes in vitro</u>	51
----------------------------------	----

- <u>Biosynthèses importantes</u>	51
---	----

- <u>Biosynthèses modérées</u>	51
--------------------------------------	----

- <u>Biosynthèses non décélables ou nulles</u>	52
--	----

- <u>Variations des aptitudes synthétisantes</u>	53
--	----

- <u>Biosynthèses des associations bactériennes</u>	53
---	----

2)- <u>Etudes in vivo</u>	54
---------------------------------	----

- <u>La vie en symbiose de la microflore intestinale</u>	54
--	----

- <u>Le régime carencé en vitamine B12 et son incidence sur la microflore</u>	55
---	----

- <u>L'utilisation des cobalamines synthétisées</u>	56
---	----

IV - CONCLUSIONS (Première Partie)	57
-------------------------------------	----

- SECONDE PARTIE -

<u>ETUDE COMPAREE DE LA CARENCE B12 CHEZ LE RAT NORMAL</u> <u>ET LE RAT AXENIQUE</u>	59
---	----

I - METHODES -

1)- <u>Animaux d'expérience</u>	61
---------------------------------------	----

2)- <u>Régimes alimentaires</u>	62
---------------------------------------	----

3)- <u>Mesures et prélèvements en cours d'expérience</u>	64
--	----

- <u>Contrôle de la croissance pondérale</u>	64
---	----

- <u>Contrôle de l'état amicrobien</u>	64
--	----

- <u>Prélèvements des fèces pour les dosages des cobalamines</u>	65
--	----

4)- <u>Examens et prélèvements en fin d'expérience</u>	65
- <u>Frottis sanguins</u>	65
- <u>Numération globulaire</u>	66
- <u>Hématocrite</u>	66
- <u>Prélèvements d'organes</u>	66
5)- <u>Extraction des cobalamines des tissus animaux</u>	67

II - EFFETS DU REGIME CARENCE B12 CHEZ LES RATS NORMAUX OU =====

AXENIQUES DE PREMIERE GENERATION ET SUR LEURS PORTEES =====

1)- <u>Régime subcarené à base de caséine dévitaminée</u>	68
- <u>Protocole expérimental</u>	68
- <u>Contrôle de la carence en cours d'expé- rience</u>	69
- Croissance pondérale	69
- Elimination fécale	70
(Effet d'une contamination par une souche productrice de cobalamines-B12 sur l'élimination fécale du rat axé- nique (Lot A)	71
- Signes hématologiques	71
- <u>Réserves en cobalamines et vitamines B12</u>	72
- Contenus de l'intestin grêle et du caecum	72
(Effet de la monoflore de <u>Veillonella</u>)	73
- Contenus des reins et du foie ...	73
(Effet de la monoflore de <u>Veillonella</u>)	74
2)- <u>Régime carencé à base de farine délipidée de soja</u>	75
a)- <u>Etude du Rat en croissance</u>	75
- <u>Protocole expérimental</u>	75
- <u>Contrôle de la carence en cours d'expérience</u>	76
- Croissance pondérale	76
- Elimination fécale	77
- Signes hématologiques	77
- <u>Contenus intestinaux et réserves en coba- lamines et vitamine B12</u>	78
- Contenus de l'intestin grêle et du caecum	78
- Contenus des reins et du foie .	78

b)- <u>Etude de la reproduction</u>	81
<u>Gestation</u>	82
<u>Viabilité des portées</u>	82
<u>Contenus en cobalamines-B12 chez les rattes et leurs portées</u>	83
- Contenus et teneurs chez les mères	84
- Contenus et teneurs des ratons à la naissance	85
- Quantité et répartition chez les ratons au sevrage	86
III - EFFETS DE LA CARENCE B12 CHEZ LES RATS NORMAUX DE =====	
PLUSIEURS GENERATIONS -	87
=====	
a)- <u>Etude du Rat en croissance</u> -	88
- <u>Protocole expérimental</u>	88
- <u>Contrôle de la carence en cours d'expérience</u>	88
- Croissance pondérale	88
- Elimination fécale	91
- Signes hématologiques	92
Numérations globulaires.....	92
Hématocrites	93
Frottis sanguins	94
- <u>Contenus intestinaux et réserves en cobalamines et vitamine B12</u>	94
- Contenus de l'intestin grêle et du caecum	94
- Contenus des reins et du foie...	96
b)- <u>Etude de la reproduction</u> -	100
- <u>Gestation et viabilité des portées</u> ...	100
- <u>Contenus et teneurs en cobalamines-B12 chez les rattes et les portées</u>	101
- Contenus et teneurs chez les mères	102
- Contenus et teneurs chez les ratons à la naissance	103
- Contenus et teneurs chez les portées de jeunes rats	104

IV - EFFETS DE LA CARENCE B12 CHEZ LES RATS AXENIQUES DE

PLUSIEURS GENERATIONS - 106

a)- Etude de la reproduction 108

- Gestation et viabilité des portées..... 108

- Malformations des embryons et des jeunes rats 112

- Contenus et teneurs en cobalamines-B12 chez les rattes et leurs portées 114

- Contenus et teneurs chez les rattes 115

- Contenus et teneurs chez les ratons à la naissance 117

- Contenus et teneurs chez les portées de jeunes rats, avant et après le sevrage 118

b)- Etude du Rat en croissance 121

- Protocole expérimental 121

- Contrôle de la carence en cours d'expérience..... 121

- Croissance pondérale 121

- Signes hématologiques 125

- Numérations globulaires.... 125

- Hématocrites 126

- Frottis sanguins 127

- Réserves en cobalamines et vitamine B12 128

- Contenus des reins et du foie 128

V - DISCUSSION SUR L'AVITAMINOSE ET LE BESOIN B12 DU RAT

1)- Age adulte 134

2)- Gestation 134

3)- Naissance et allaitement 135

4)- Signes de l'avitaminose B12 135

5)- Les réserves dans l'avitaminose B12 137

6)- Le besoin en vitamine B12 du Rat 138

VI - CONCLUSIONS (Seconde Partie) 140

FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

9, QUAI SAINT BERNARD - PARIS V*

SERVICE DE LA SCOLARITÉ

Bureau des Enseignements du 3^e Cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - P

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : d ' E T A T

THESE DE : ES - SCIENCES NATURELLES

Nom : V A L E N C I A

Prénoms : Richard

Né (e) le 1^{er} FEVRIER 1925 à NALGRAT ~~deux~~ ESPAGNE

SUJETS

1ère THESE : Synthèse des cobalamines par la flore intestinale et
avitaminose B12 chez le rat normal et le rat axénique, ...

2e THESE (Propositions faites par la Faculté) :

Vu et permis d'imprimer

Paris, le

Le Recteur de l'Académie
de Paris



Vu et approuvé

Paris, le 5 JANVIER 1971.

Le Doyen de la Faculté
des Sciences de Paris

[Signature]

